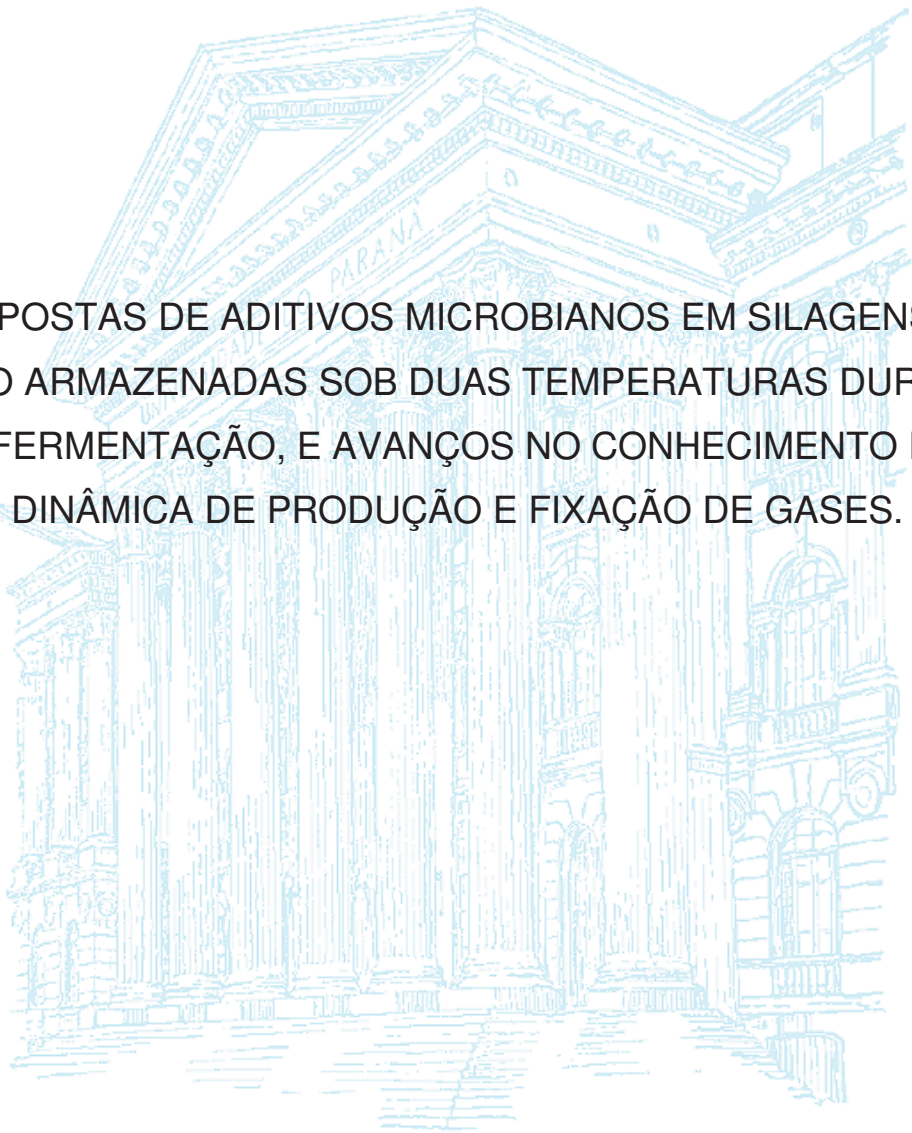


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CHARLES ORTIZ NOVINSKI



RESPOSTAS DE ADITIVOS MICROBIANOS EM SILAGENS DE  
MILHO ARMAZENADAS SOB DUAS TEMPERATURAS DURANTE  
A FERMENTAÇÃO, E AVANÇOS NO CONHECIMENTO DA  
DINÂMICA DE PRODUÇÃO E FIXAÇÃO DE GASES.

CURITIBA  
2018

CHARLES ORTIZ NOVINSKI

RESPOSTAS DE ADITIVOS MICROBIANOS EM SILAGENS DE  
MILHO ARMAZENADAS SOB DUAS TEMPERATURAS DURANTE  
A FERMENTAÇÃO, E AVANÇOS NO CONHECIMENTO DA  
DINÂMICA DE PRODUÇÃO E FIXAÇÃO DE GASES.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Patrick Schmidt

CURITIBA  
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, DOUGLAS ALEX JANKOSKI CRB 9/1167  
COM OS DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

N943r

Novinski, Charles Ortiz

Respostas de aditivos microbianos em silagens de milho armazenadas sob duas temperaturas durante a fermentação, e avanços no conhecimento da dinâmica de produção e fixação de gases. / Charles Ortiz Novinski. - Curitiba, 2018. 122 f.: il. grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Orientador: Patrick Schmidt

1. Silagem - Aditivos. 2. Milho - Silagem. 3. Silagem. 4. Carbono - Fixação. I. Schmidt, Patrick. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDU 636.085.52



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CHARLES ORTIZ NOVINSKI** intitulada: **"Respostas de aditivos microbianos em silagens de milho armazenadas sob duas temperaturas durante a fermentação, e avanços no conhecimento da dinâmica de produção e fixação de gases"**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.


A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 16 de Abril de 2018.

  
PATRICK SCHMIDT  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
MIKAEL NEUMANN  
Avaliador Externo (UNICENTRO)

  
RODRIGO DE ALMEIDA  
Avaliador Interno (UFPR)

  
ANA LUISA PALHANO SILVA  
Avaliador Externo (UTP)

À minha família pelo apoio incondicional.  
DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

À minha família, meus Pais e irmãos. Em especial minha esposa **Rita de Cássia** que sempre ao meu lado me incentivando, apoiando e fazendo-me acreditar que é possível. Agradeço, admiro e reconheço sua força e dedicação em tudo que você faz. Agradeço por aguentar todos os meus imprevistos e atrasos (que sempre acontecem) e pelas revisões. Aos meus filhos **Luiz Eduardo e Pedro Henrique**. Ao Luiz peço desculpa pela minha ausência e pelos vários **nãos** que ouviu quando pedia para brincarmos juntos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Patrick Schmidt**, que confiou em mim durante todo esse trajeto e que é responsável pelas várias oportunidades e todo crescimento em minha vida profissional. Ao meu amigo Schmidt pelos convites para as brassagens, pelas cervejas e pelos conselhos.

À Professora Dr<sup>a</sup> **Maity Zopollatto** por possibilitar o desenvolvimento desse projeto e por todo o apoio quando precisei.

Ao grupo CPFOR. Aos antigos integrantes **Elinton, Severino, Eduardo**. Aos atuais **Rasiel, Ariadne, Denise** e em especial à **Lucelia** que cuidou do meu bebê e pela fundamental ajuda na formatação da tese.

À todos os professores que contribuíram para minha formação.

À Universidade Federal do Paraná, e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Ao Laboratório de Bromatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, na Universidade de São Paulo e à todos envolvidos.

Aos funcionários da fazenda Canguiri pelas contribuições na realização dos experimentos.

Ao Professor Dr. **Limin Kung Jr.** pelo acolhimento e pelos ensinamentos durante o estágio na Universidade de Delaware. À **Erica, Kasey e Liz** pela recepção no laboratório e pela ajuda.

Agradeço *In Memoriam* a **Karla Rapahela Voltolini** que insistiu que eu fizesse mestrado e assim iniciasse minha vida Acadêmica.

E ao Sr. **Agostinho Medeiros do Nascimento** pela valiosa ajuda durante todos  
esses anos. Meu eterno agradecimento.

A Lallemand pelo financiamento desse projeto.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo no Brasil e pela bolsa de estudo  
nos Estado Unidos.

“O homem precisa passar por dificuldades para aprender a valorizar o  
sucesso”. (A.P.J. Abdul Kalam)



## RESUMO

Existe uma grande variedade de aditivos indicados para utilização em silagens e que atuam em diferentes fases do processo de produção desse volumoso. De maneira geral, os aditivos são usados para melhorar a recuperação de matéria seca (MS) e energia, aumentar a digestibilidade dos nutrientes e permitir maior estabilidade da silagem pós abertura do silo. No que se refere ao desenvolvimento de aditivos microbianos as pesquisas se concentram na seleção de bactérias especializadas na produção de determinados ácidos, visando os mesmos objetivos supracitados. A inconsistência na resposta desses produtos é devida a inúmeras variáveis envolvidas durante a condução dos experimentos que podem alterar completamente os resultados, sobretudo, quando inoculantes microbianos são utilizados. Em algumas regiões do mundo, particularmente em países de clima tropical, a produção de silagens apresenta os maiores desafios climáticos, principalmente pelas elevadas temperaturas associadas com alta umidade. Essa condição ambiental favorece a proliferação de micro-organismos durante o crescimento das plantas ainda lavoura aumentando a incidências de doenças. Quando essas plantas são ensiladas muitos desses patógenos podem afetar o perfil fermentativo da silagem, elevando as perdas de nutrientes e reduzindo a estabilidade aeróbia. Sabendo que os inoculantes utilizados no Brasil são derivados de cepas bacterianas selecionadas na Europa e Estados Unidos parte da variação dos resultados pode ser justificada. Raramente os estudos comparam o efeito da temperatura de armazenamento sobre a fermentação de silagens de milho tratadas com aditivos microbianos. Da mesma forma, pouca ou nenhuma discussão é realizada para diminuição do impacto ambiental, principalmente na emissão de carbono durante a fermentação de silagens. Não há relatos de estudos utilizando ou investigando bactérias capazes de aumentar a recuperação de MS e a concentração de ácidos orgânicos pela fixação biológica de CO<sub>2</sub>. Essa tese tem o objetivo de questionar a utilização de aditivos microbianos sem considerar os fatores ambientais envolvidos na produção de silagens de milho e fomentar a discussão na seleção de novos micro-organismos com conceitos nunca abordados em silagens. A seção revisão de literatura apresenta informações sobre as bactérias utilizadas como aditivos em silagens e o impacto do ambiente sobre a atividade desses organismos. A segunda parte, ainda na revisão de literatura, é uma investigação que tem o objetivo entender e explicar a pressão negativa no interior dos silos, que vem acontecendo com frequências em nossos experimentos. Com base nas informações até o momento tudo indica que esse efeito possa ser causado pela atividade de bactérias homoacetogênicas. Para responder os questionamentos dessa tese foram realizados dois experimentos. No Capítulo I é apresentado um experimento realizado em 2015 utilizando bactérias heteroláticas facultativas (aditivos comerciais) em silagens de milho armazenadas em sala com temperatura controlada com avaliação da produção de gases e pressão interna durante a fase de estocagem. O Capítulo II apresenta o segundo experimento realizado em 2016 que utilizou os mesmos aditivos, porém comparou duas temperaturas de armazenamento (ambientes quente e frio) sobre as características fermentativas, produção de gases e pressão interna nos silos.

Palavras-chaves: aditivo, armazenamento, fixação de carbono, temperatura

## ABSTRACT

There is a variety of additives that are recommended to ensiling forages, which work in a different phase of the production process. Overall, the objective of using additives is to increase the dry matter (DM) and energy recovery, improve the nutrients digestibility, and allows better aerobic stability after opening the silo. In relation to new microbial additives development, the focus of researchers is on select bacteria specialized in the production of specific acids to reach the same result mentioned before. However, the results variability and effectiveness do the silage additives recommendation questionable. The lack of data consistency of additives occurs by the many factors involved in the experiment conducting that can affect the end results, especially, when microbial inoculants are evaluated. In many parts of the world, notably in tropical weather conditions, the silage production faces several climatic challenges, mainly the factors related to a high temperature associated with high humid. This condition predisposes to the growth of microorganisms during the plant-growing season increasing the disease incidence. When these plants are ensiling those undesirable microorganisms can affect the fermentative profile, increasing the nutrient losses and reducing the aerobic stability. Brazilian bacterial inoculants are derived from strains isolated in Europe and North America, so part of this inconsistency result can be explained. Scarcely studies examined storage temperature effects on corn silage fermentation treated with bacterial additives. In the same way, little or nothing is known about the environmental impact reduction, especially carbon emission from silage fermentation, using or studying bacteria who has the ability to increase the DM recovery and acid concentration by the carbon dioxide sequestration. The aim of the present thesis is to open up the debate for the inoculants using without considering the environmental factors on the silage production, and also encourage the discussion about the microorganism selection, as inoculants, in the views never been mentioned before. In the **literature review** section is presented information about bacterias which are used to making silage and the environmental impact on this microorganisms. The second part, into the literature review section, is a survey that has the objective to comprehend and try to explain the negative internal pressure inside the experimental silos. This phenomenon has been occurring frequently in our studies. Based on the present information we suppose that this effects may happen by homoacetogenic bacteria activities. In order to answer the questions were conducted two experiment. In chapter I, is shown the results with facultative heterofermentative bacteria (commercial additive) on the corn whole-plant ensiling assessment. The silos were storage for 91 days in the controlled-temperature room and the gases production, and the internal pressure were measured. The chapter II, is shown the second experiment, ran in 2016, where the same group of bacterial (commercial additives) was evaluated, whereas the silos were kept in two different storage temperatures (hot and cool) and fermentative profile, gases production, and internal pressure were analized.

Key-words: additive, carbon assimilation, temperature, storage

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MICRORGANISMOS FERMENTADORES DE GÁS DE SÍNTESE..	32
FIGURA 2: VIAS METABÓLICAS DE BACTÉRIAS ACETOGENICAS.....	36
FIGURA 3: ESQUEMA DE SISTEMA INTEGRADO PARA FERMENTAÇÃO DE GASES.....	39
FIGURA 4: OXIDAÇÃO E REDUÇÃO DA GLICOSE PELAS BACTÉRIAS ACETOGENICAS.....	42
FIGURA 5. VISÃO GERAL DO MANÔMETRO DE COLUNA DE ÁGUA E DETALHE DO NÍVEL DA ÁGUA NO INTERIOR DOS TUBOS.....	57
FIGURA 6: PRODUÇÃO DE GASES NAS PRIMEIRAS 24 HORAS APÓS A ENSILAGEM, MOSTRANDO O PICO MÁXIMO DE PRODUÇÃO PRÓXIMO ÀS 12 HORAS.....	71
FIGURA 7: PRODUÇÃO ACUMULADA DE GÁS NAS 48 HORAS APÓS A ENSILAGEM .....	72
FIGURA 8: DINÂMICA DE PRODUÇÃO DE GÁS EM 36 HORAS APÓS A ENSILAGEM .....	72
FIGURA 9: PRESSÃO INTERNA DOS SILOS EXPRESSA EM mmCA APÓS 93 DIAS DE ENSILAGEM .....	73
FIGURA 10: PRODUÇÃO ACUMULADA DE GÁS POR TRATAMENTO AMBIENTE FRIO (15,2 °C) .....	103
FIGURA 11: PRODUÇÃO ACUMULADA DE GÁS POR TRATAMENTO AMBIENTE QUENTE (27,1 °C).....	104
FIGURA 12: PRODUÇÃO DE GÁS COMPARANDO O EFEITO DE TEMPERATURA .....	105
FIGURA 13: DINÂMICA DA PRESSÃO NEGATIVA NOS SILOS ARMAZENADOS EM TEMPERATURA QUENTE (27,1 °C) .....	106
FIGURA 14: DINÂMICA DA PRESSÃO NEGATIVA NOS SILOS ARMAZENADOS EM TEMPERATURA FRIA (15,2 °C).....	107

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1: PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ESTUDADOS EM SILAGENS DE MILHO E SEUS EFEITOS.....	21
QUADRO 2: EXEMPLOS DE BACTÉRIAS HOMOACETOGÊNICAS E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO (TEMPERATURA E PH).....	40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DO MILHO ANTES DA ENSILAGEM .....	62
TABELA 2: POPULAÇÃO EPIFÍTICA DO MILHO PRÉ-ENSILAGEM COM DOIS INTERVALOS DE COLETA DE AMOSTRA.....	63
TABELA 3: COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DA SILAGEM DE MILHO APÓS 93 DIAS DE ARMAZENAMENTO .....	64
TABELA 4: COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E ÁCIDO LÁTICO EM SILAGEM DE MILHO.....	67
TABELA 5: AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE AERÓBIA EM SILAGENS DE MILHO .....	69
TABELA 6: CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS, LEVEDURAS E FUNGOS EM SILAGEM DE MILHO .....	70
TABELA 7: COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DO MILHO ANTES DA ENSILAGEM .....	88
TABELA 8: COMPOSIÇÃO BROMATOLOGICA DAS SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVO MICROBIANO.....	89
TABELA 9: DESDOBRAMENTO DO EFEITO DA TEMPERATURA AMBIENTE SOBRE A COMPOSIÇÃO BROMATOLOGICA DAS SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS.....	91
TABELA 10: CONTAGENS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS, LEVEDURAS E FUNGOS EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS.....	91
TABELA 11: DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS E TEMPERATURAS PARA CONTAGEM DE LEVEDURAS EM SILAGENS DE MILHO (LOG UFC g <sup>-1</sup> MV) .....	93
TABELA 12: CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS.....	94
TABELA 13: DESDOBRAMENTO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO E ACÉTICO EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS.....	94
TABELA 14: DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DE TRATAMENTO E TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO E ACÉTICO EM	

SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS (g kg <sup>-1</sup> MS).....	97
TABELA 15: VARIÁVEIS DE ESTABILIDADE EM AEROBIOSE DE SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVO MICROBIANO .....	98
Tabela 16: DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE TRATAMENTO E TEMPERATURA E EFEITO DE TEMPERATURA PARA ESTABILIDADE AERÓBIA (HORAS) EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS.....	100
TABELA 17: DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DE TRATAMENTO E TEMPERATURA PARA PERDAS DE MS (%) DURANTE A ESTABILIDADE AERÓBIA EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS.....	101
TABELA 18: PRODUÇÃO TOTAL DE GASES (MENSURAÇÃO DIRETA) DURANTE A FASE FERMENTATIVA DE SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVO MICROBIANO.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGV	- ÁCIDO GRAXO VOLÁTIL
BAL	- BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS;
CS	- CARBOIDRATOS SOLÚVEIS;
EA	- ESTABILIDADE AERÓBIA;
FDA	- FIBRA INSOLÚVEL EM DETERGENTE ÁCIDO;
FDN	- FIBRA INSOLÚVEL EM DETERGENTE NEUTRO;
MM	- MATÉRIA MINERAL;
mmHg	- MILÍMETRO DE COLUNA DE MERCÚRIO
mmCA	- MILÍMETRO DE COLUNA DE ÁGUA
MS	- MATÉRIA SECA;
MS <sub>corr</sub>	- MATÉRIA SECA CORRIGIDA;
PB	- PROTEÍNA BRUTA;
PMS	- PERDAS DE MATÉRIA SECA;
PMSE	- PERDAS DE MATÉRIA SECA NA ESTABILIDADE;
Tacum	- TEMPERATURA ACUMULADA;
TMax	- TEMPERATURA MÁXIMA
TempTmax	- TEMPO PARA ATINGIR A TEMPERATURA MÁXIMA;
UFC	- UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS;

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
2.1 Aspectos gerais na utilização de inoculantes microbianos na ensilagem de milho.....	20
2.2 Efeito da temperatura sobre a fermentação .....	22
2.3 Efeito da temperatura sobre a atividade de micro-organismos .....	24
2.4 Efeito da temperatura sobre a composição bromatológica .....	26
2.5 Efeito da temperatura sobre a estabilidade aeróbia .....	26
2.6 Novas perspectivas de estudos na microbiologia de silagens.....	27
2.7 Avaliação da produção de gases durante a fase fermentativa de silagens .....	28
2.8 Solubilidade do CO <sub>2</sub> na água presente na silagem .....	30
2.9 Bactérias sintetizadoras de acetato a partir de gás hidrogênio (H <sub>2</sub> ) e dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) .....	31
2.10 Utilização das bactérias acetogênicas e homoacetogênicas (SYNGAS) .....	36
2.11 Bioquímica das bactérias homoacetogênicas .....	41
2.12 Importância do pH do meio de cultivo para a atividade dos micro-organismos homoacetogênicos.....	43
<b>3.0 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.0 CAPÍTULO I - EFEITO DE ADITIVOS BACTERIANOS SOBRE A QUALIDADE DE SILAGENS DE MILHO E DINÂMICA DA PRESSÃO INTERNA DE SILOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>52</b>
Resumo .....	52
Abstract .....	53
<b>4.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Sistema de coleta de gases e medição de pressão .....	56
4.2.2 Ensilagem e tratamentos.....	58
4.2.3 Abertura dos silos e determinação de perdas fermentativas.....	59
4.2.4 Coleta e processamento das amostras .....	59
4.2.5 Plaqueamento e contagem microbiológica.....	60
4.2.6 Estabilidade aeróbica pós-abertura .....	60



4.2.7 Delineamento experimental e Análise estatística .....	61
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>4.5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>
<b>5 CAPITULO II- EFEITO DA TEMPERATURA AMBIENTE NA FERMENTAÇÃO DE SILAGENS DE MILHO INOCULADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS COMERCIAIS.....</b>	<b>79</b>
Resumo .....	79
Abstract .....	80
<b>5.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>82</b>
5.2.1 Ensilagem e armazenamento .....	83
5.2.2 Sistema de coleta de gases e medição de pressão .....	83
5.2.3 Abertura dos silos e determinação de perdas fermentativas.....	84
5.2.4 Coleta e processamento das amostras .....	84
5.2.5 Plaqueamento e contagem microbiológica.....	85
5.2.6 Estabilidade aeróbica pós-abertura .....	86
5.2.7 Delineamento e Análise estatística .....	86
<b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>5.4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>108</b>
<b>7.0 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>109</b>
<b>7.1 LISTA DE REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

O processo de transformação da forragem úmida em silagem acontece por uma complexa comunidade de microrganismos. Para que isso ocorra, esses organismos, além de estarem em um ambiente anaeróbio, precisam converter açúcares solúveis, presentes nas plantas, em ácidos orgânicos (Woolford, 1990). Como resultado final, o material permanece preservado por longos períodos, uma vez que o crescimento de agentes deterioradores é inibido pelo baixo pH (Weinberg e Muck, 1996).

Como forma de acelerar a queda do pH durante o processo fermentativo, aditivos microbianos são adicionados à forragem. A grande maioria dos produtos comerciais utiliza bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), devido à facilidade de crescimento e metabolismo desses organismos nesse ambiente e à capacidade que o ácido láctico tem em reduzir o pH. Bactérias produtoras de ácidos graxos voláteis (AGV), chamadas de heterofermentativas, formam outro grupo de organismos utilizados de maneira estratégica para manter a qualidade da forragem e promover o controle de agentes específicos. Driehuis et al. (1996) relataram que silagens tratadas com *Lactobacillus buchneri* foram mais estáveis após a abertura do silo do que silagens não tratadas. Davies (2010), que é contrário ao uso de bactérias heterofermentativas como aditivos, argumenta que a produção de ácido acético leva à formação de CO<sub>2</sub>, ocasionando perdas de energia e matéria seca, gerando perdas econômicas e passivo ambiental, fatores que são utilizados para justificar a contraindicação desses organismos. Porém, apesar da formação de CO<sub>2</sub> e perdas de MS quando se utilizam organismos heteroláticos, os maiores benefícios são observados após a abertura do silo e no desempenho animal (Driehuis et al., 1999; Schmidt et al., 2014).

A produção de CO<sub>2</sub> em silagens e formas de redução dessa emissão há anos vêm sendo discutidas (McDonald et al., 1991). Os avanços nas pesquisas nos últimos anos e o desenvolvimento de aditivos modernos com a descoberta de novas bactérias (Ávila et al., 2014; Santos et al., 2017) e novos aditivos químicos (Da Silva et al., 2017), vêm possibilitando a redução de perdas durante a fermentação. No entanto, esses trabalhos concentram esforços na redução e combate aos organismos considerados indesejáveis devido à

produção de compostos menos nobres como o CO<sub>2</sub>. Até o momento não há relatos de experimentos para recuperação e fixação do CO<sub>2</sub> na produção de silagens.

O fato é que, na opinião dos especialistas, e os resultados científicos da inoculação microbiana em silagens são muito controversos (Weissbach, 2011). Grande parte das críticas vem em virtude dos resultados inconsistentes quando se utilizam essas bactérias. Kung Jr. (2009) listou algumas variáveis que podem justificar tais efeitos. Segundo esse autor, a incorreta aplicação do produto sobre a massa é a principal causa de falha dos aditivos. Adesogan e Kim (2005) reforçam o argumento anterior afirmando que as condições ambientais, principalmente nos países tropicais, são responsáveis por boa parte da redução da eficiência dos inoculantes, uma vez que a proliferação de bactérias e fungos indesejáveis é beneficiada neste clima. Dessa forma, a resposta do aditivo em diferentes condições geográficas deve ser levada em consideração para justificar os resultados dos trabalhos publicados.

Os objetivos desse trabalho foram avaliar os efeitos de diferentes temperaturas ambientais durante a fermentação, associadas à inoculação de aditivos microbianos, em silagens de milho, sobre características químicas, biológicas e produção de gases. Ainda, apresentamos um estudo sobre o comportamento de formação e absorção de gases no interior dos silos experimentais durante a fase de armazenamento de silagens de milho.

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais na utilização de inoculantes microbianos na ensilagem de milho

O armazenamento de forragens úmidas em condições anaeróbicas induz alguns microrganismos a utilizarem vias alternativas para oxidação de substrato necessário ao crescimento. Durante o processo fermentativo das silagens, carboidratos solúveis presentes na planta são utilizados como substrato para crescimento e desenvolvimento de microrganismos. Como consequência, ocorre a produção de ácidos orgânicos. Se houver predominância da fermentação homolática, cujo produto final é o ácido láctico, boa parte da matéria seca e energia da forragem serão preservadas, mantendo a qualidade da silagem muito próxima ao da planta que foi colhida.

Os principais carboidratos não estruturais encontrados na planta de milho são sacarose, glicose e frutose, dos quais a sacarose representa aproximadamente 65 – 75 % (McAllan e Phipps, 1977). O resultado final da fermentação de hexoses (glicose, frutose) pelos microrganismos homoláticos é a geração de 2 lactatos + 2 ATP e 2 H<sub>2</sub>O . Por outro lado, maiores perdas totais de MS são observadas quando há predominância de fermentação heterolática. Pois, apesar da elevada eficiência desses microrganismos na geração de ATP por mol de hexose consumido (equivalente a 4 ATP por hexose), parte do substrato é transformado em gases que são liberados para o ambiente, basicamente na forma de dióxido de carbono, contabilizando as perdas. Os produtos finais da fermentação heterolática por mol de hexose podem ser resumidos da seguinte forma: lactato + etanol + AGV + CO<sub>2</sub> + 4 ATP + H<sub>2</sub>O (McDonald et al., 1991).

A preferência pela fermentação homolática é justificada pela maior capacidade do ácido láctico em baixar o pH do meio quando comparado com os AGVs produzidos na via heterolática. Assim, o resultado final é a rápida paralisação da atividade microbiana na massa, com maior preservação de compostos e menores perdas de MS (McDonald et al., 1991).

Apesar da variada população microbiana presente na silagem, apenas um pequeno grupo recebe atenção nas pesquisas envolvendo microbiologia

(Quadro 1). Parte desse grupo é intensamente estudada tendo em conta os benefícios para o processo fermentativo e controle de organismos deterioradores. Outro grupo diz respeito às bactérias que causam perdas econômicas e/ou riscos sanitários aos animais e às pessoas que entram em contato com silagens contaminadas.

QUADRO 1: PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ESTUDADOS EM SILAGENS DE MILHO E SEUS EFEITOS ESPERADOS		
<b>Microrganismo</b>	<b>Interesse</b>	<b>Efeito<sup>1</sup></b>
Bactérias ácido lácticas	desejável	Acelerar queda do pH
Bactérias ácido acéticas	desejável	Produção de AGV
Bactérias ácido propiônico	desejável	Produção de AGV
Clostrídios	indesejável	Quebra de proteínas, Produção de AGV e outros compostos
Enterobactérias	indesejável	Produção de endotoxinas, CO <sub>2</sub>
Listeria	indesejável	Doenças em humanos e animais
Leveduras	indesejável	Produção de etanol, CO <sub>2</sub> e consumo de substrato
Fungos	indesejável	Produção de micotoxinas e CO <sub>2</sub>

<sup>1</sup> AGV – ácidos graxos voláteis  
Adaptado de McDonald et al. (1991)

Weinberg e Muck (1996) sugeriram novos critérios para pesquisas e desenvolvimento de inoculantes para silagens. As diretrizes adotadas deveriam considerar: 1) utilização de bactérias ácido lácticas (BAL) específicas para determinadas culturas; 2) inclusão de bactérias heterofermentativas produtoras de ácidos graxos voláteis capazes de inibir o crescimento de leveduras e fungos; 3) inclusão de outros organismos diferentes das BAL para controle de agentes deterioradores; 4) seleção e modificação de cepas de BAL para inibir microrganismos específicos; 5) clonagem e expressão gênica, possibilitando a seleção de cepas de BAL capazes de utilizar polissacarídeos em plantas que apresentam baixo conteúdo de carboidratos solúveis. E de fato, a direção das linhas de pesquisas com aditivos nos últimos anos foram no sentido sugerido pelos autores (Oliveira et al., 2017). Porém, a visão sobre a utilização estratégica de microrganismos em silagens não teve grandes mudanças, e as discussões se concentram em diminuição de perdas e combate aos agentes indesejáveis.

No entanto, questões fundamentais normalmente não são consideradas quando novos aditivos são desenvolvidos (Weinberg e Ashbell 1994). Um detalhe importantíssimo sobre a seleção de cepas bacterianas é saber como elas se comportam em condições climáticas adversas. Parte importante das pesquisas e laboratórios que desenvolvem aditivos estão localizados em regiões de clima temperado. Logo, as bactérias presentes nos inoculantes são adaptadas àquelas condições climáticas, onde foram isoladas e selecionadas.

Muck et al. (2003) comentam que a temperatura tem papel fundamental nas características da planta e nos processos bioquímicos antes e depois da ensilagem. Adesogan e Kim (2005) compararam duas temperaturas de armazenamento (20 e 40 °C) em silagens de milho estocadas por 82 dias. Esses autores notaram que silagens estocadas em condições de temperatura elevadas (40 °C) tiveram maior estabilidade aeróbica (45,6 horas) quando comparada com as silagens controle (13,3 horas). Eles atribuíram esse efeito a baixa concentração de ácido lático e carboidratos solúveis que culminou na reduzida população de leveduras ( $4,42 \log \text{ ufc g}^{-1} \text{ MV}$ ), em especial nas assimiladoras de lactato. Por outro lado, Weinberg et al. (2001) não encontraram efeito na estabilidade aeróbia quando compararam silagens armazenadas em temperaturas distintas (28 e 41°C). Portanto, o comportamento dos microrganismos em condições desafiadoras (por exemplo, regiões de clima tropical) precisa ser avaliado (Filya, 2003) assim como a formulação de aditivos para essas condições (Weinberg et al., 2001).

## 2.2 Efeito da temperatura sobre a fermentação

A produção de calor na silagem é um processo normal durante a fermentação. Se a ensilagem seguir as boas práticas de produção, com compactação e vedação adequadas, a temperatura da massa não será maior que 8 graus em relação à temperatura ambiente (Ashbell e Kashanchi, 1987). Entretanto, a temperatura da massa pode atingir valores próximos a 50°C nas camadas superficiais quando há atrasos na vedação do silo (Novinski, dados não publicados), comprometendo seriamente a atividade das bactérias produtoras de ácido lático (BAL).

Os resultados da utilização de inoculantes em silagens apresentam grande variação (Oliveira et al., 2017). Muck e Kung (1997) compilaram dados de experimentos com inoculantes microbianos entre 1990 e 1995 e relataram que em mais de 1/3 desses ensaios os aditivos não apresentaram benefícios. As possíveis causas para essa variação foram apresentadas por Kung et al. (2003), e entre elas foram destacadas cepas erradas de bactérias para determinadas culturas, baixa disponibilidade de carboidratos solúveis na forragem, quantidade excessiva de oxigênio. A ação do conjunto desses fatores acarreta em aumento da temperatura da massa ensilada e deve ser consideradas quando se utilizam bactérias como aditivos na silagem. Essa variável está entre as principais causas que afetam a atividade dos microrganismos, uma vez que temperaturas acima de 40°C podem prejudicar o crescimento de muitas cepas de BAL (Weinberg e Ashbell, 1994). Neste contexto, dois pontos devem ser destacados: Primeiro – aumento da temperatura em razão de erros de manejo durante a produção de silagem, principalmente falhas de compactação e vedação; Segundo – fatores ambientais que levam ao incremento da temperatura da silagem.

O primeiro caso é facilmente contornado com a correta aplicação das técnicas de produção de silagem como: ponto de colheita, tamanho de partícula, compactação e vedação (Muck e Holmes, 1999). Uma vez finalizada a fermentação a temperatura cai lentamente para valores entre 25 – 30 °C. Silos menores (bags ou bolas) podem esfriar mais rapidamente, sendo que a velocidade de resfriamento depende das condições do clima e em alguns casos as silagens podem permanecer quentes (>40 °C) por mais de 5 semanas (Ashbell e Kashanchi, 1987).

O segundo ponto apresenta as maiores limitações para uso de inoculantes em silagens produzidas em climas quentes. Nesta hipótese, as tomadas de decisão para contornar os problemas são mais complexas. Modelos matemáticos foram desenvolvidos para estimar a elevação da temperatura da massa pela ação de microrganismos e os efeitos sobre parâmetros de qualidade de silagens (Courtin e Spoelstra, 1990), mas a variável ambiente não é considerada, mesmo que estudos mostrem que o padrão fermentativo de silagens é fortemente afetado pela temperatura externa ao silo (Weinberg et al., 2001).

Ashbell e Kashanchi (1987) demonstraram que silos comerciais tipo Bunker tiveram forte influência da temperatura externa na retenção de calor, principalmente nas camadas da superfície. Essas avaliações foram feitas em condição de clima subtropical durante 1 ano, com temperatura máxima registrada de 42,8°C na superfície interna do silo, enquanto que a temperatura ambiente atingiu 30 °C. Neste mesmo ensaio foi percebida influência da temperatura externa nas camadas mais inferiores do silo (1,4 metros de profundidade), demonstrando que o ambiente causa interferência em grandes extensões do silo.

### 2.3 Efeito da temperatura sobre a atividade de microrganismos

A alteração na composição dos ácidos graxos voláteis das silagens, realizada pelo metabolismo microbiano, durante a fase de estocagem, há tempos é discutida (McDonald et al., 1991). No entanto, os fatores que podem influenciar e determinar essas mudanças ainda hoje são estudados (Zhou et al., 2016). Uma das formas de avaliar a intensidade da atividade de cada microrganismo é pela análise do perfil de ácidos graxos voláteis.

O objetivo na produção de silagens é proporcionar um ambiente favorável para garantir o crescimento e desenvolvimento dos grupos de bactéria homofermentativas e heterofermentativas facultativas. Como representantes desse último grupo temos: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*. Silagens tratadas com esses organismos geralmente apresentam baixo pH, menores concentrações de ácido acético e butírico e maior conteúdo de ácido láctico em relação a silagens não tratadas (Muck e Kung, 1997). No entanto, o simples fato de adicionar essas bactérias durante a ensilagem não garante os resultados esperados. Isso porque a população de microrganismos presente na silagem (epifíticos ou inoculados) sofre grande influência do meio onde estão se desenvolvendo. Fatores como condução da lavoura (Teller et al., 2012), teor de umidade da planta (Adesogan et al., 2005), condições ambientais (Kim e Adesogan, 2006; Ashbell et al., 2002) podem mudar completamente o resultado final da fermentação.



A produção de silagem em regiões de clima tropical enfrenta uma série de desafios para obtenção de volumoso de boa qualidade. A combinação de calor e umidade, fatores característicos nessas regiões, é responsável pela proliferação de fungos e bactérias espoliadoras nas plantas. Quando essas plantas são colhidas e ensiladas, esses agentes podem causar efeitos adversos durante a fermentação e na estabilidade aeróbica das silagens (Garcia et al., 1989; Muck, 1987).

Silagens produzidas e armazenadas sob altas temperaturas apresentam menores concentrações de ácido láctico (Ashbell et al., 2002) e maiores perdas de MS, causadas pela alteração de fermentação láctica para butírica (McDonald et al., 1966). Adesogan e Kim (2005) relataram diferença na concentração de ácidos em silagens de milho armazenadas a 40°C por 82 dias. Os teores de ácido láctico, acético e AGV total nessas silagens foram de 39, 17 e 110 g kg<sup>-1</sup> MS, respectivamente, enquanto que nas silagens controle a concentração foi de 67, 24, 146 g kg<sup>-1</sup> MS, na mesma ordem. Como consequência direta da menor concentração de ácido láctico o pH passou de 3,76, nas silagens controle (20°C), para 4,23, nas silagens em ambiente quente (40°C).

Estudos com silagens produzidas em temperaturas baixas são escassos na literatura. A exemplo das silagens produzidas em altas temperaturas, os mesmos problemas podem ser encontrados quando condições opostas (ex. regiões frias) estão presentes durante a produção da silagem. Geralmente esses materiais apresentam baixa concentração de ácidos, consequentemente pH mais alto (Kung, 2010), maior concentração de carboidratos solúveis e alta contagem de leveduras (Zhou et al., 2016).

Temperatura ambiente menor (<10°C) pode favorecer indiretamente a atividade de leveduras na massa ensilada pela redução da taxa metabólica. Com o metabolismo mais baixo, a retirada de prótons liberados pelos ácidos orgânicos no interior da célula é otimizada. Além disso, a baixa temperatura pode reduzir a eficiência desses ácidos pela redução da permeabilidade na membrana celular das leveduras (Beales, 2004), ou seja, com menos ácido passando para o interior da célula e a maior capacidade de retirada dos prótons, as leveduras são capazes de sobreviver em silagens em condições de clima frio.

## 2.4 Efeito da temperatura sobre a composição bromatológica

Temperaturas entre 30 e 40°C podem afetar diretamente a composição bromatológica das silagens. Reduções na fração FDN e FDA foram observadas em silagens estocadas a 40 °C (FDN 420 g kg<sup>-1</sup> MS) em relação às silagens mantidas a 20°C (442 g kg<sup>-1</sup> MS) e aumentos no teor de amido (362 g kg<sup>-1</sup> MS para 427 g kg<sup>-1</sup> MS) e digestibilidade *in vitro* da MS (62 para 65,8 %) (Adesogan e Kim, 2005). A redução na concentração de fibras e aumento na digestibilidade em silagens mantidas em altas temperaturas confirmam a afirmação de hidrólise da hemicelulose (xilose e arabinose) feita por Dewar et al. (1963), uma vez que a atividade das enzimas hemicelulases são maiores em temperaturas entre 30 e 40°C (Pitt, 1990). No entanto, a elevada temperatura de ensilagem aumentou a concentração de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA). A diminuição na disponibilidade de proteína é reflexo do aumento da temperatura com a formação de complexos entre esse aminoácido e carboidratos (Muck et al., 2003). Somado a esse efeito, Kim e Adesogan (2006) encontram aumentos expressivo no teor de N-amoniaco em silagens armazenadas em temperaturas altas (40°C). Esse efeito é consequência da maior atividade proteolítica das enzimas das plantas e das bactérias em altas temperaturas (Weinberg et al., 2001; Muck e Dickerson, 1988)

Pensando pelo lado prático, o aquecimento, desde que controlado, pode favorecer a ação das enzimas de origens bacterianas e/ou exógenas. Algumas cepas de *L. plantarum* são capazes de produzir celulasas e xilanases (Scheirlinck et al., 1990), enquanto outras podem expressar atividade de amilases (Fitzsimons et al., 1994). Assim, muito embora a temperatura ocasione efeito deletério na qualidade das silagens, parte das perdas pode ser compensada pela atividade de algumas enzimas sobre o amido e as fibras.

## 2.5 Efeito da temperatura sobre a estabilidade aeróbia

Além da alteração durante a fermentação, a temperatura ambiente continua causando efeitos deletérios após a abertura do silo e retirada da silagem (Ashbell et al., 2002), apesar de temperaturas abaixo de 10 e acima de

40°C tornarem as silagens mais estáveis em aerobiose. Esse efeito é explicado pela forte influência da temperatura sobre a atividade de leveduras (McDolnald et al., 1991). As leveduras apresentam alta atividade metabólica logo após a abertura dos silos, principalmente se a temperatura estiver entre 20 e 30°C (Ashbell et al., 2002). Por outro lado, Weinberg et al. (2001) mostraram que silagens de trigo estocadas a 41°C foram menos estáveis em aerobiose em relação a silagens armazenadas a 24°C.

Zhou et al. (2016) investigaram o efeito da temperatura de armazenamento em silagens de milho estocadas á 5, 10, 15, 20, e 25°C. Esses autores identificaram espécies de BAL nunca antes relatadas em silagens de milho armazenadas em temperaturas abaixo de 10°C, mostrando que a temperatura pode favorecer ou prejudicar o desenvolvimento dos microrganismos. Nesta amplitude de temperatura (10°C) a relação láctico:acético foi próxima de 1, sugerindo fermentação heterolática com predominância dos *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus*. De forma similar Kim e Adesogan (2006) encontraram diminuição na relação láctico:acético, porém as silagens estavam em temperatura de 40 °C. Weinberg et al. (2001) descreveram diminuição nessa relação a medida que a temperatura de armazenamento foi aumentando (28 > 37 > 41°C) e justificaram esse efeito pela redução na população de BAL. Dessa forma, fica claro a importância de conhecer as amplitudes de temperaturas na silagem e seus efeitos sobre a fermentação do material, principalmente quando se utilizam inoculantes microbianos na ensilagem.

## 2.6 Novas perspectivas de estudos na microbiologia de silagens

Outro ponto importante que deve ser ressaltado sobre o desenvolvimento de novos inoculantes para silagens é a possibilidade de redução dos possíveis impactos ambientais causados por essa prática. Souza (2015) demonstrou o passivo ambiental que esse método de conservação de forragem pode gerar, haja vista a produção de gases do efeito estufa e compostos orgânicos voláteis (COV). Contudo, a autora relatou um comportamento desconhecido até então, ou ignorado, nos ensaios laboratoriais

com silagens. Ela apontou, de maneira inédita, a possibilidade de fixação de gases pelos microrganismos durante a fase anaeróbia das silagens.

Uma hipótese para o efeito de fixação desses compostos (dióxido de carbono,  $H_2$ , nitrogênio atmosférico) pode ser explicada pela respiração anaeróbia. Esse conceito é muito discutido em nutrição de ruminantes por estar envolvido na produção de metano no rúmen. Neste caso, as oxidações biológicas para produção de energia não utilizam o  $O_2$  comoceptor de elétrons, ou seja, nitrato, sulfato ou carbonato ( $CO_2$ ) são utilizados para esse fim (Stanier et al., 1969). O produto mais conhecido da redução do  $CO_2$  é o metano, porém outros compostos, tais como: ácido acético, podem ser gerados a partir do processo biológico por meio de outras bactérias.

A via metabólica de Wood-Ljungdahl é a forma que as bactérias produzem acetato a partir de  $CO_2$ . Esses organismos são conhecidos como acetogênicos e homoacetogênicos e crescem utilizando o  $H_2$  como doador de elétrons, e o dióxido de carbono como oceptor final de elétrons (Ljungdahl, 1994). O metabolismo de bactérias capazes de produzir ácido acético a partir de gases como  $CO_2$  e o  $H_2$  durante a fermentação de silagens nunca foi estudada ou descrita até o presente momento. Ainda que as investigações iniciais realizadas no presente trabalho tenham sido superficiais, restam claras as possibilidades disponíveis para descrição de novas bactérias co-existent em silagens, com conceitos nunca antes aplicados na conservação de forragens.

## 2.7 Avaliação da produção de gases durante a fase fermentativa de silagens

A avaliação da produção de gases em silos experimentais é uma variável utilizada como indicativo do padrão fermentativo em silagens. O conceito é simples, pois quanto maior a produção de gases, mais intensa é atividade de organismos indesejáveis que causam perdas de matéria seca e energia da silagem. O método normalmente utilizado para essa avaliação consiste na determinação gravimétrica das perdas, mediante adaptação do silo experimental (baldes, tubos de PVC ou jarras) com uma válvula fixada na tampa que permite o escape dos gases produzidos durante a fermentação para o ambiente. Teoricamente essa válvula deveria impedir a entrada do ar atmosférico para o interior do silo, mas durante a abertura dos experimentos é

comum notar silagem mofada ao redor desse acessório, mostrando que a vedação não é totalmente eficiente.

Para determinação da amplitude de produção de gases são utilizadas equações (Jobim et al., 2007) que permitem estimar e caracterizar os tipos de perdas. Os cálculos podem ser divididos em três categorias: Perdas totais (gases+efluente), perdas por gases e perdas via efluente. Basicamente esses cálculos levam em consideração a diferença de peso em MS inicial quando da ensilagem e ao final do experimento. Assim, a variação na quantidade de MS ensilada é utilizada para estimativa das perdas por gases.

As formas indiretas de avaliação das perdas apresentam alguns pontos que merecem ser debatidos. O primeiro fator é a amostragem para determinação do teor de MS. Como dito anteriormente, os cálculos sugeridos por Jobim et al. (2007) são efetuados todos na base de matéria seca. Dessa forma, se a coleta de amostra é mal executada, todos os resultados posteriores podem ser comprometidos. Outra importante questão diz respeito à secagem da silagem em estufa que provoca a volatilização de alguns compostos que carregam consigo frações de MS. Esse é um efeito discutido há tempos, mas que muitos trabalhos ignoram, e não fazem a correção do teor MS para determinar as perdas, acarretando em superestimativas. Uma forma proposta para resolver esse problema é a coleta total dos gases produzidos durante a fase fermentativa. Até o momento, poucos pesquisadores trabalharam no desenvolvimento de silos experimentais que permitem esse tipo de avaliação (Schmidt et al., 2012; Souza, 2014; Knicky et al., 2014; Daniel et al., 2015; Novinski et al., 2016). Muitos desses autores encontraram correlação positiva entre produção de gás e perdas de MS, afirmando ser um método confiável para estimativas do padrão fermentativo.

A avaliação da produção de gases no Centro de Pesquisas em Forragicultura (CPFOR) da Universidade Federal do Paraná, começou em 2010, com a adaptação dos silos (baldes plásticos de 18 L) e tubos de látex conectando o silo à uma câmara de armazenamento, com mensuração do volume de gás produzido. A evolução dessa técnica permitiu observar muitas falhas que acontecem durante ensaios com silagem. O princípio básico para a obtenção de silagens de alta qualidade é a criação de um ambiente totalmente livre de oxigênio para crescimento de bactérias anaeróbias. O desenvolvimento

dessa metodologia mostrou que os silos experimentais tradicionalmente usados para avaliação de silagem não são eficientes em evitar a entrada de ar atmosférico para o interior do silo, revelando que boa parte dos silos apresenta algum grau de estresse aeróbico durante o armazenamento causado pela vedação deficiente das tampas. Esse efeito deletério permaneceu mesmo após várias tentativas de vedação das bordas da tampa com o corpo do balde. A solução do problema veio somente após a construção de silos experimentais que permitissem uma vedação hermética.

Um fato que é frequentemente observado nos experimentos que utilizam os novos modelos de silo, é que posteriormente à fase de produção de gases, no início do processo fermentativo, ocorre um período de estagnação e logo em seguida um efeito reverso, com o aparecimento de vácuo no interior do silo (Schmidt et al., 2012).

Por ser um efeito até então desconhecido, e que se repetia ao longo de diferentes ensaios, o grupo prosseguiu formulando algumas hipóteses para tentar explicar esse efeito: 1) Acomodação da massa no interior do silo que causava a pressão negativa. Essa teoria foi descartada após injeções de ar atmosférico, sem estabilização da pressão (Souza, 2015). 2) Diferenças de temperatura causando dilatação e contração dos gases no interior do silo. Essa hipótese também foi rejeitada após ensaios com manutenção dos silos em ambiente com controle constante de temperatura. Nesse trabalho de tese de doutorado conseguimos dar novas contribuições para o entendimento desse efeito.

## 2.8 Solubilidade do CO<sub>2</sub> na água presente na silagem

O desaparecimento de CO<sub>2</sub> no interior de silos experimentais completamente vedados nunca foi relatado, conforme buscas na literatura. Por isso não está claro quais os mecanismos ou vias que podem contribuir para a absorção desse gás pela silagem.

Muito embora a fixação biológica de CO<sub>2</sub> na silagem pareça ser a explicação mais provável para esse fenômeno, outras hipóteses precisavam ser consideradas.

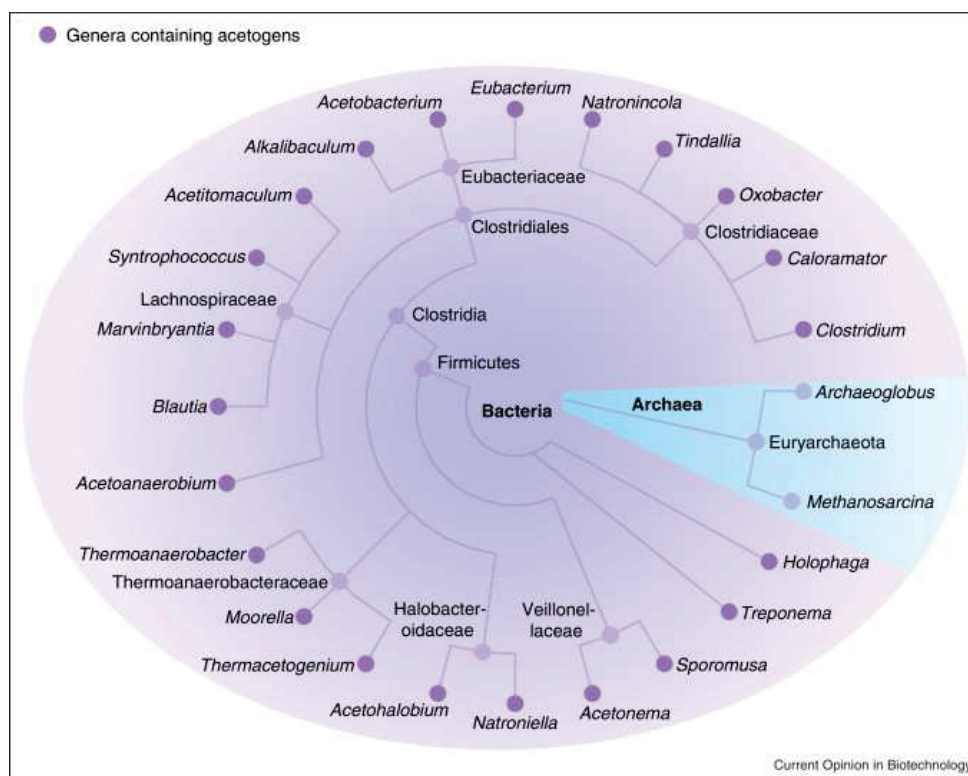
Outra possibilidade para de fixação de CO<sub>2</sub> na silagem é a reação química desse gás com a água presente no material. A solubilidade do dióxido de carbono poderia explicar a variação de pressão observada em alguns ensaios avaliando a produção de gases em silagens (Schmidt et al., 2012; Novinski et al., 2016). A solubilidade do CO<sub>2</sub> na água é diretamente proporcional à pressão atmosférica e inversamente relacionada com a temperatura (Szikszay, 1993), ou seja, para que ocorra a solubilização e fixação do CO<sub>2</sub> é necessário haver aumento da pressão no interior do silo. Com o aumento da pressão as moléculas dos gases são “forçadas” para dentro do meio aquoso e ficam retidas na solução desde que essa condição permaneça. Assim, quanto maior a pressão exercida pelo ambiente externo, mais retido estará o gás na fase líquida. Como explicado pela Lei de Henry, sobre a solubilidade dos gases em líquidos, a solubilidade é proporcional à pressão exercida pelo gás que está acima do líquido (Atkins e de Paula, 2008). Dessa forma, a solubilidade do CO<sub>2</sub> na água da silagem poderia ocorrer somente nos primeiros estágios de fermentação, e sem o escape adequado dos gases produzidos, onde a elevada produção de CO<sub>2</sub> causaria aumento na pressão interna dos silos, prestando veracidade à Lei de Henry. Já no estágio final de fermentação a dissolução de CO<sub>2</sub> não ocorreria, uma vez que não haveria pressão suficiente para solubilizar os gases no líquido. Essa hipótese também não demonstra ser uma explicação para o desaparecimento do CO<sub>2</sub>.

## 2.9 Bactérias sintetizadoras de acetato a partir de gás hidrogênio (H<sub>2</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)

Os primeiros relatos sobre as bactérias capazes de reduzir CO<sub>2</sub> para acetato (acetogênicas) começaram no final da década de 60. Ljungdahl e Wood (1969) apresentaram uma lista de bactérias que possuem a capacidade de utilização de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> como substrato para produção de acetato em anaerobiose: *Clostridium acidurici*; *C. cylindrosporum*; *C. formicoaceticum*; *C. thermoaceticum* (*Moorella thermoacetica*); *C. aceticum*; *Peptococcus glycinophilus*; *Eubacterium limosum* (*Butyrivacterium rettgeri*).



As bactérias acetogênicas podem ser encontradas nos filos Acidobactérias, Firmicutes e Espiroqueta (Figura 1). Estão presentes nos mais diversos ambientes e podem ser isoladas em praticamente todos os habitats. Acetogênicas são bactérias anaeróbicas obrigatórias capazes de reduzir  $\text{CO}_2$  com  $\text{H}_2$  para acetato pela via do Acetil-CoA, conhecida como via de Wood-Ljungdahl (Drake e Küsel 2003).



**FIGURA 1:** MICRORGANISMOS FERMENTADORES DE GÁS DE SÍNTESE. COM EXCEÇÃO DAS ARQUEAS, TODOS OS OUTROS MICRORGANISMOS COM ESSA HABILIDADE SÃO CLASSIFICADOS COMO HOMOACETOGÊNICOS.  
FONTE: (LATIF ET AL., 2014)

A rota do Acetil-CoA consiste de dois ramos que juntos reduzem  $\text{CO}_2$  para Acetil-CoA e pode servir como fonte de carbono para síntese de biomassa (Ljungdahl, 1994). De maneira geral, a redução de  $\text{CO}_2$  para acetato, com o hidrogênio como doador de elétrons, tem uma troca de energia de aproximadamente -100 kJ por mol de acetato sintetizado (Drake e Küsel, 2003). A energia é conservada pela geração de prótons ou um potencial quimiosmótico dependente de sódio que pode ser acoplada para a síntese de ATP pela ATPase. Um gradiente quimiosmótico presente na membrana celular é responsável pela conservação de energia em bactérias acetogênicas. Alguns



microrganismos como *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium aceticum* e *Moorella thermoacetica* possuem citocromos e menaquinona na membrana que indica a formação de gradientes de prótons (Botelho, 2016). Outros apresentam um complexo proteico ligado à membrana chamado de Complexo-RNF que tem a função de catalisar a oxidação da ferredoxina reduzida e a transferência de elétrons ao  $\text{NAD}^+$ , gerando ferredoxina oxidada e NADH. Como sugerido por Tremblay et al. (2012) o Complexo-RNF atua como uma bomba de prótons para redução da ferredoxina, efetuando o transporte ativo de  $\text{NA}^+$  ou  $\text{H}^+$  para fora da célula.

Existem 19 gêneros de bactérias que podem utilizar a via do Acetil-CoA e são nomeadas como acetogênicas, dentre elas: *Acetivomaculum*, *Acetobacterium*, *Acetohalobium*, *Acetonema*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Ruminococcus*, *Sporomusa*, *Thermoacetogenium* e *Treponema* (Drake e Küsel, 2003).

A síntese de acetato a partir de 2 mols de  $\text{CO}_2$ , com  $\text{H}_2$  como doador de elétrons permite o crescimento das bactérias acetogênicas. Para tanto, essa via deve estar ligada a uma rede de formação de ATP (Buckel e Thauer, 2013). Essa rota metabólica pode ser considerada a primeira via autotrófica responsável pela produção de biomassa no início do planeta terra, sendo, portanto, a via bioquímica mais antiga (Drake e Küsel, 2003).

Essas bactérias apresentam uma flexibilidade metabólica podendo se desenvolver nas mais variadas condições ambientais. Muitas delas são encontradas em ambientes completamente ausentes de oxigênio (anóxico), tais como: trato gastrointestinal, sedimentos marinhos (salinos), lodo de lagoas de decantação (Drake, 1994), intestinos de cupins (Boga e Brune, 2000).

A via de Wood-Ljungdahl pode ocorrer em ambas às direções de oxidação e redução. A transformação de  $\text{CO}_2$  em acetato é um processo de redução e o acetato pode ser convertido novamente para  $\text{CO}_2$  por meio da oxidação (Devarapalli e Atiyeh, 2015). Essa via ocorre em dois ramos, Metil e Carbonil, que tem como início a assimilação de CO ou  $\text{CO}_2$  (Latif et al., 2014). Após a formação do Acetil-CoA este pode ser convertido em outros produtos, incluindo acetato, etanol e biomassa (Figura 2).

No ramo Carbonil ocorrem as seguintes reações:

1. Se o  $\text{CO}_2$  for assimilado, há oxidação de ferredoxina pela ação do complexo enzimático monóxido de carbono desidrogenase/acetil-CoAsintase (CODH/ACS) para produção de CO. No entanto, se houver assimilação direta de CO este processo não ocorre.

No ramo Metil ocorrem as seguintes etapas:

1. Se o CO for assimilado, primeiro ocorre uma redução de ferredoxina e  $\text{H}_2\text{O}$ , mediada pela enzima monóxido de carbonodesidrogenase (CODH), resultando na geração de  $\text{CO}_2$ . Se houver assimilação direta de  $\text{CO}_2$  esta etapa não ocorre;

2. Com o  $\text{CO}_2$  disponível no ramo Metil tem-se a oxidação de Formato pela enzima formatodesidrogenase (FDH);

3. Síntese de Formil-tetrahidrofolato (Formil-THF) pela enzima Formil-tetrahidrofolatosintetase (FTHFS), com gasto de 1 ATP;

4. Síntese de Metenil-tetrahidrofolato (Metenil-THF) pela enzima meteniltetrahidrofolatociclohidrolase (MTHFC);

5. Síntese de Metileno-tetrahidrofolato (Metileno-THF) pela desidrogenação de NADH na ação enzimática de metileno tetrahidrofolatodesidrogenase (MTHFD);

6. Síntese de metil-tetrahidrofolato (Metil-THF) pela ação da enzima metilenotetrahidrofolatoredutase (MTHFR);

7. Síntese de metil-proteína corrinóideferro-enzofre (Metil-CoFeSP), mediada pela enzima metil transferase (MET) e liberação de tetrahidrofolato (THF), que ficará disponível para novas formações de formil-tetrahidrofolato (Formil-THF);

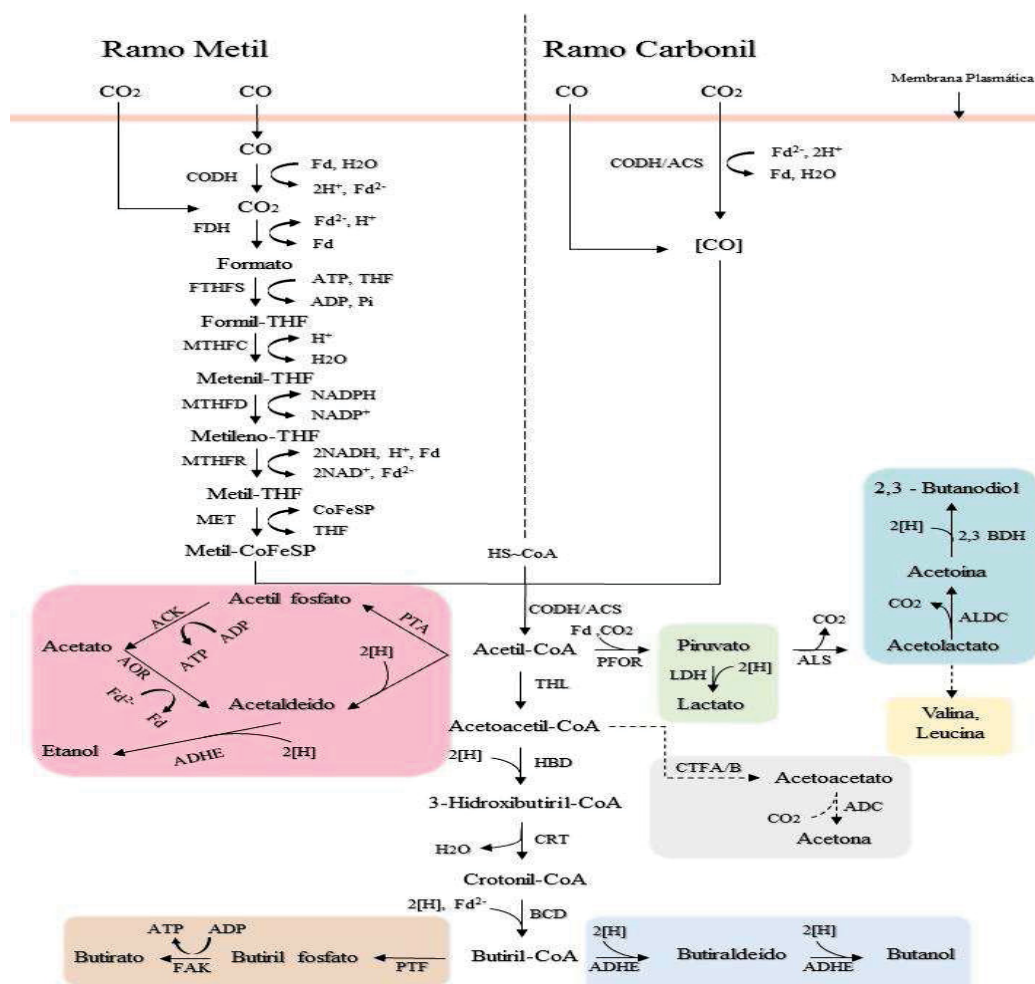
A união dos ramos Metil e Carbonil acontece da seguinte forma:

1. Síntese de Acetil-CoA pela atividade do complexo enzimático monóxido de carbono desidrogenase/Acetil-CoA (CODH/ACS) que liga a proteína Metil corrinóide ferro-enzofre (Metil-CoFeSP), do ramo Metila, com o CO, do ramo Carbonila e Coenzima A, ocasionando a liberação da proteína ferro-enzofre corrinóide (CoFeSP);

O Acetil-CoA gerado pode ser utilizado para formação direta de biomassa ou sofrer ação da fosfotranscetilase, e posteriormente da acetoquinase para gerar 1 ATP e 1 acetato. Portanto, uma molécula de ATP é formada por fosforilação ao nível de substrato. Dessa forma, nenhuma produção líquida de ATP é observada durante o autotrofismo (Botelho, 2016).

Durante a primeira fase no ramo Metil, a possibilidade de assimilação de CO seguida da ação da CODH há a geração de dois prótons e dois elétrons que podem ser utilizados como insumo para a reação da formatodesidrogenase na próxima reação.

Pode-se concluir que a via Wood-Ljungdahl sustenta o crescimento autotrófico apenas com monóxido de carbono, sem a necessidade de  $H_2$  para doação de elétrons. Em condições heterotróficas, ácidos orgânicos, açúcares simples, álcoois, podem servir como doadores de elétrons pela mesma rota metabólica (Drake e Küsel, 2003).



**FIGURA 2:** VIAS METABÓLICAS DE BACTÉRIAS ACETOGENÍCAS. VIA WOOD-LJUNGDAHL COM RAMO METIL E CARBONIL. ROTAS METABÓLICAS DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS A PARTIR DE ACETIL-COA. ABREVIACOES: CODH, MONÓXIDO DE CARBONO DESIDROGENASE; CODH/ACS, MONÓXIDO DE CARBONO DESIDROGENASE/ACETIL-COASINTASE; FDH, FORMATO DESIDROGENASE; FTHFS, FORMIL-TETRAHIDROFOLATO SINTETASE; MTHFC, METENIL TETRAHIDROFOLATO CICLOHIDROLASE; MTHFD, METILENO TETRAHIDROFOLATO DESIDROGENASE; MTHFR, METILENO TETRAHIDROFOLATO REDUTASE; MET, METIL TRANSFERASE; THL, TIOLASE; HBD, 3-HIDROXYBUTIRIL-COA DESIDROGENASE; CRT, CROTONASE; BCD, BUTIRIL-COA DESIDROGENASE; PTA, FOSFOTRANSACETILASE; ACK, ACETATOQUINASE; AOR, ALDEÍDO:FERRODOXINA DESIDROGENASE; ADHE, ALDEÍDO/ÁLCOOL DESIDROGENASE; PFOR, PIRUVATO FERRODOXINA OXIRREDUTASE; LDH, LACTATO DESIDROGENASE; ALS, ACETOLACTATO SINTASE; ALDC, ACETOLACTATO DESCARBOXILASE; 2,3 BDH, 2,3 BUTANODIOL DESIDROGENASE; CTFA/B, ACETOACETIL-COA:ACETATO/BUTIRATO-O-TRANSFERASE; PTF, FOSFOTRANSFERASE; FAK, ÁCIDO GRAXO QUINASE; FD, FERRODOXINA OXIDADA; FD<sub>2</sub><sup>-</sup>, FERRODOXINA REDUZIDA; THF, TETRAHIDROFOLATO; COFESP, PROTEÍNA FERRO ENXOFRE CORRINOÍDE ADAPTADO DE (DEVARAPALLI E ATIYEH, 2015).

## 2.10 Utilização das bactérias acetogênicas e homoacetogênicas (SYNGAS)

Bactérias acetogênicas vêm sendo estudadas intensamente nos últimos anos principalmente pelas indústrias farmacêutica, petroquímica, têxtil e biocommodities (acetato, ácido láctico, butirato, 2,3 butanodiol e acetona).

As questões ambientais ligadas aos acordos internacionais para redução das emissões de gases do efeito estufa, destino adequado para os resíduos gerados pelas indústrias e a busca por biocombustíveis são as principais fontes financiadoras dessas pesquisas hoje. A indústria de commodities químicas e combustíveis vem realizando grandes investimentos para o aprimoramento da fermentação de gás de síntese (SYNGAS). A utilização dessa biotecnologia permite a produção de combustíveis e ácidos orgânicos pelo aproveitamento de resíduo gasoso gerado nos processos de pirólise e gaseificação nas indústrias do aço e petroquímica (Zhang et al., 2013). Essas duas fontes de gás de síntese apresentam sérios problemas relacionados com impacto ambiental, principalmente pela emissão de gases do efeito estufa ( $\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$ ). Outra forma importante para obtenção de gás de síntese é pela fermentação de resíduos agrícolas (biomassa), tratamento de esgoto urbano e dejetos de animais.

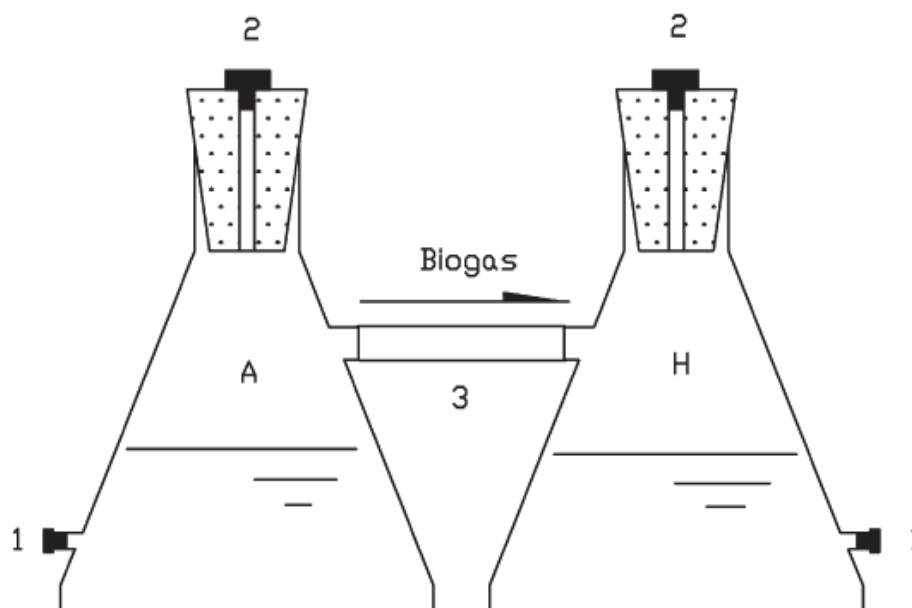
O gás de síntese é composto por  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e pequenas porções de  $\text{CH}_4$  e  $\text{N}_2$ . No processo de fermentação de gás de síntese, microrganismos são capazes de assimilar os gases como fonte de carbono para produção de outros compostos, entre eles: acetato, butirato, etanol (Munasinghe e Khanal, 2011).

Dentre os gases utilizados, o hidrogênio e o dióxido de carbono ganham papel de destaque na produção de acetato. Os dois gases estão presentes durante a fase fermentativa e a fase de consumo. Durante a fermentação primária as bactérias acidogênicas utilizam carboidratos, proteínas e lipídios para produção de ácidos orgânicos,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . Na fermentação secundária, as bactérias acetogênicas e homoacetogênicas têm as maiores contribuições na produção de acetato. As bactérias acetogênicas fermentam os ácidos produzidos durante a primeira fase em  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e acetato, enquanto as homoacetogênicas reduzem  $\text{CO}_2$  com  $\text{H}_2$  para formação de acetato. Homoacetogênicas são as bactérias acetogênicas que mudam seu metabolismo em condições de estresse (ex. competição por substrato), para o crescimento autotrófico utilizando  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  (Saady, 2013). A principal diferença entre essas bactérias está mais relacionada ao tipo de crescimento trófico e metabolismo do que ao filo genético. As bactérias homoacetogênicas pertencem a diversos filos como: *Acetobacterium*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Sporomusa*. Esses organismos são encontrados em

grandes populações em digestores anaeróbicos (Ryan et al., 2005) e apresentam versatilidade metabólica e alta capacidade de utilizar diversos tipos de substratos.

A utilização das bactérias acedogênicas e homoacetogênicas pode ser conduzida simultaneamente em bioreatores ou de forma separada. Chen et al. (2003) obtiveram significativa concentração de acetato a partir de  $H_2$  e  $CO_2$  em um reator simultâneo para tratamento de chorume de aterro sanitário utilizando os dois grupos de bactérias. Outro sistema para fermentação de gases é a construção de dois reatores. O primeiro é responsável pela fermentação inicial e produção dos gases  $CO_2$  e  $H_2$ , e o segundo abriga as bactérias responsáveis pela fermentação dos gases produzidos na primeira fermentação (Figura 3).

Em experimento desenvolvido por Nie et al. (2007), no qual foram construídos dois reatores para avaliar a atividade das bactérias homoacetogênicas, o reator A recebeu uma mistura de resíduo para tratamento, glicose, solução tamponante e inóculo (lodo de tratamento de resíduo líquido de cervejaria) e o reator H somente solução mineral + inóculo. A única comunicação entre os reatores era um tubo que direcionava os gases produzidos no container A para o H. A análise de AGV no reator H revelou a presença de acetato na concentração de  $0,58 \text{ g L}^{-1}$  em 240 horas de experimento. Os pesquisadores concluíram que esse resultado demonstra a homoacetogênese a partir de  $CO_2$  e  $H_2$  (Figura 3).



**FIGURA 3:** ESQUEMA DE SISTEMA INTEGRADO PARA FERMENTAÇÃO DE GASES. A: BIO-REATOR PARA CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ACETOGENÍCAS. H: BIO-REATOR PARA CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS HOMOACETOGENÍCAS. O GÁS PRODUZIDO NO REATOR A É TRANSFERIDO PARA O REATOR H PELO TUBO 3. ADAPTADO DE: NIE ET AL. (2007).

Dentro desse processo de produção as bactérias homoacetogênicas vêm ganhando destaque. Nesse momento é importante distinguir dois conceitos: acetogênese e homoacetogênese.

Acetogênese é a produção de acetato pelas bactérias acetogênicas heterotróficas por meio da oxidação de ácidos orgânicos como: butírico, propiônico, ácido valérico (Parawira et al., 2004). Homoacetogênese é a formação de acetato por microrganismos acetogênicos autotróficos com a redução de  $\text{CO}_2$  com  $\text{H}_2$ . Dessa forma, os dois grupos geram acetato, no entanto, os primeiros produzem  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ , e os segundos consomem (Nie et al., 2007). O fato é que esses microrganismos nunca receberam atenção em pesquisas com silagens e o potencial de utilização ainda não foi estudado. A investigação e isolamento das bactérias homoacetogênicas em silagens, e a capacidade dessas bactérias em fixar o  $\text{CO}_2$  produzido pelos organismos acidogênicos precisa ser estudada.

*Clostridium* e *Acetobacterium* são os organismos autotrófico e heterotrófico homoacetogênicos mais comuns encontrados em lagoas para tratamento de resíduos de esgoto (Abreu et al., 2007). Os organismos

homoacetogênicos podem oxidar ou sintetizar acetato em função da concentração externa de  $H_2$  e por isso são grandes competidores com as *archaea* metanogênicas em baixo pH. No Quadro 2 são descritas algumas espécies de bactérias homoacetogênicas.

**QUADRO 2:** EXEMPLOS DE BACTÉRIAS HOMOACETOGENICAS E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO (TEMPERATURA E pH)

<i>Espécie de bactéria</i>	temperatura	pH
<i>Acetobacterium sp.</i>	27-30	NI
<i>Acetoanaerobium</i>	Mesófilo	NI
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	NI	NI
<i>C. formicoaceticum</i>	NI	NI
<i>C. drakei</i>	5-40	3,6-7,4
<i>Moorella thermoacetica</i>	NI	5,7-7,7
<i>Acetonema longum</i>	NI	NI

<sup>1</sup> NI – NÃO INFORMADO

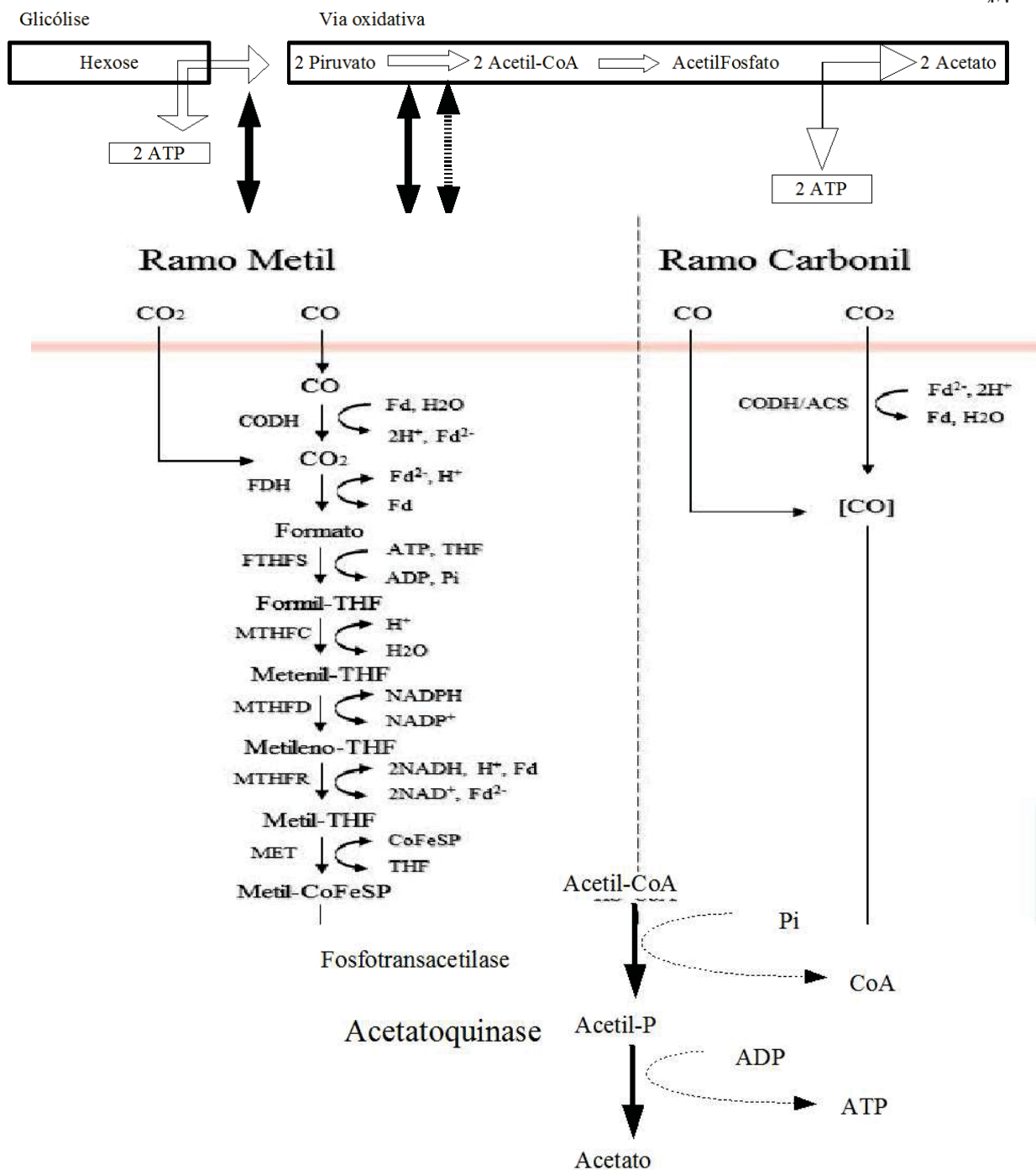
ADAPTADO DE: SAADY (2013).

As pesquisas com as bactérias acetogênicas e homoacetogênicas encontram alguns desafios. Entre eles a sensibilidade das enzimas, presentes no metabolismo dessas bactérias, para a presença de oxigênio e que por isso requerem um ambiente estritamente anaeróbico para manutenção da atividade. Assim, como é de conhecimento geral, a completa vedação em silos experimentais é dificilmente alcançada e o estudo da atividade dessas bactérias é comprometido. Devido à falta de padronização e utilização de vários tipos de silos experimentais, trabalhos com silagens podem apresentar algumas limitações no estudo das bactérias homoacetogênicas. Outra forma de avaliar a atividade dessas bactérias poderia ser pela análise da concentração de acetato, no entanto, não existe qualquer parâmetro que possa diferenciar o produto formado pela via oxidativa ou pela via redutiva, a não ser que se utilizem substratos marcados radioativamente.



### 2.11 Bioquímica das bactérias homoacetogênicas

As bactérias homoacetogênicas podem converter 1 mol de hexoses em 3 mol de acetato (Figura 4), sendo que 2 mol de acetato são produzidos pela via oxidativa (oxidação do piruvato para acetato), com a produção de 8 mol de equivalentes redutores e  $\text{CO}_2$ . Já o terceiro mol de acetato é produzido pela via de redução (via de Wood-Ljungdahl), na qual o  $\text{CO}_2$  é reduzido com o  $\text{H}_2$  (Drake, 1994).



**FIGURA 4:** OXIDAÇÃO E REDUÇÃO DA GLICOSE PELAS BACTÉRIAS ACETOGENICAS: GLICÓLISE > CONVERSÃO DE 1 MOL DE GLICOSE PARA 2 MOL DE PIRUVATO E 4 MOL DE EQUIVALENTE REDUTOR, COM PRODUÇÃO LÍQUIDA DE 2 ATP POR FOSFORILAÇÃO A NÍVEL DE SUBSTRATO. VIA OXIDATIVA > CONVERSÃO DE PIRUVATO PARA 2 MOL DE ACETATO E 4 MOL DE EQUIVALENTE REDUTOR, COM PRODUÇÃO LÍQUIDA DE 2 ATP. VIA DE WOOD-LJUNGDAHL - UTILIZAÇÃO DE 8 MOL DE EQUIVALENTE REDUTOR PARA REDUZIR 2 MOL DE CO<sub>2</sub> PARA 1 MOL DE ACETATO. ESSA VIA É COMPOSTA POR DOIS RAMOS (METIL E CARBONIL), PELOS QUAIS O ACETATO É SINTETIZADO. DESSA FORMA, A VIA UTILIZADA PELAS HOMOACETOGENICAS CONTRIBUI COM 1/3 DO ACETATO PRODUZIDO QUANDO A GLICOSE É EXCLUSIVAMENTE UTILIZADA.

ADAPTADO DE: DRAKE, 1994.

A utilização da via do Aceti-CoA não é a principal forma de crescimento das homoacetogênicas. Essas bactérias empregam essa rota alternativa somente quando o substrato (açúcares) se esgota (Nie et al., 2008). Em biodigestores adequadamente balanceados as bactérias homoacetogênicas utilizam o crescimento heterotrófico por ser uma forma mais rápida para conseguir energia em relação ao crescimento autotrófico. Por outro lado, em condições de estresse, como desbalanço na atividade metabólica, baixa disponibilidade de  $H_2$  e mudança no pH, ocorre uma alteração no metabolismo para aliviar os efeitos que podem inibir a atividade das bactérias homoacetogênicas. É possível ainda durante a fermentação ocorrer a produção e o consumo de  $H_2$  e  $CO_2$ , muito embora poucos trabalhos tenham investigado essa possibilidade em biorreatores com cultura mista (Dinamarca, 2010).

## 2.12 Importância do pH do meio de cultivo para a atividade dos microrganismos homoacetogênicos

O pH é um importante fator de estresse para manutenção da atividade dos microrganismos em biodigestores. Em sistemas que visam a produção de combustíveis e biocommodities, a quantidade e o tipo de AGVs produzidos é fortemente dependente do pH. Quando o pH se encontra entre 4,0 e 5,0 a produção de propionato é favorecida, enquanto que pH na faixa de 6,0 e 7,0 promove a formação de acetato e butirato (Zoetemeyer Jr. et al., 1982). Clostrídios produzem ácidos em pH levemente básico e mudam seu metabolismo em pH ácido (abaixo de 5) para produção de compostos com pH neutro como etanol, butanol, formato (Wiegel et al., 2006). Segundo McDonald et al. (1991), as vias metabólicas que resultam na formação de etanol, entre outros produtos que não o ácido butírico, não são aproveitadas com frequência pelos Clostrídios, porém, quando utilizadas, a atividade ocorre nos estágios finais de fermentação das silagens, quando o pH é mais baixo. Essa afirmação contradiz o entendimento que o pH baixo ( $> 4,2$ ) interrompe a atividade desse grupo de bactérias (McDonald et al., 1991). A atividade dos microrganismos é afetada pelo pH do meio, seja na silagem ou em biodigestores (Stanier et al., 1969), porém não é interrompido.

A taxa de crescimento de alguns grupos de bactérias anaeróbicas muda conforme a variação do pH e cada grupo apresenta um intervalo ótimo de desenvolvimento. As bactérias acidogênicas apresentam máxima atividade em pH 5,9 (Horiuchi et al., 1999), ao passo que as acetogênicas, e metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclasticas se desenvolvem bem em pH próximo a 7 (Gujer e Zehnder, 1983). O baixo pH pode limitar o consumo de  $H_2$  pelas metanogênicas hidrogenotróficas, mas não afeta a atividade das homoacetogênicas (Luo et al., 2011) em ambientes com pH inicial de 5,5 e temperatura acima de 37°C. A utilização de  $H_2$  para produção de combustível é uma promissora fonte de energia renovável, devido a sua alta concentração energética 122 kJ g, 2,75 vezes maior do que dos combustíveis fósseis. No entanto, o principal desafio durante a fase de produção do  $H_2$  é controlar os microrganismos homoacetogênicos que consomem esse produto.

Uma das estratégias sugeridas para inativação de alguns organismos indesejáveis é o abaixamento do pH (Wang e Wan, 2009). Entretanto, o uso isolado desse método não é eficiente para controlar todas as bactérias e a presença de homoacetogênicos acidófilos pode ser observada mesmo em pH de 3,8 (Kotsyurbenko et al., 2007).

Conforme mencionado, essa rota metabólica e os microrganismos capazes de realizá-la nunca foram descritos ou estudados em silagens. Contudo, o embasamento teórico proveniente de outras áreas do conhecimento nos indica ser possível o desenvolvimento e a atividade dessas bactérias em silagens. Esse processo explica de forma consistente o efeito da absorção de gases observado de forma constante nos experimentos desenvolvidos no CPFOR.

### 3.0 REFERÊNCIAS

ASHBELL, G., WEINBERG, Z. G., HEN, Y., FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silage. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.28, p. 261-263. 2002.

ASHBELL, G. and KASHNCHI, Y. In-silo losses from wheat ensiled in bunker silos in a subtropical climate. **Journal of Science Agriculture** v. 40, p. 95 -103. 1987.

ATKINS, P. W., PAULA, J. **Físico-química**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. Volume 2. 2008.

ABREU, A. A, DANKO, A. S, ALVES, M. M. Bio-hydrogen production in an EGSB reactor under mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic conditions. Presented in poster session PT01 eBiohydrogen. **11<sup>th</sup> IWA World Congress on anaerobic digestions**, p. 23-27. 2007.

ADESOGAN, A. T., HUISDEN, M., ARRIOLA, K. G., KIM, S. C., FOSTER, J. Factors affecting the quality of corn silage grown in hot, humid areas. 2: Effect of applying two dual-purpose inoculants or molasses. **Journal of Animal Science**. v 83 (supple. 1). Abstract 665, p. 383. 2005.

ADESOGAN, A. T., and KIM, S. C. Factors affecting the quality of corn silage grown in hot, humid areas 1: Effect of delayed sealing, simulated rainfall and ensiling temperature. **Journal of Animal Science**. v. 83, p. 383-387. 2005.

ÁVILA, C. L. S., CARVALHO, B. F., PINTO, J. C., DUARTE, W. F., SCHWAN, R. F., The use of Lactobacillus species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal Animal Science**. v. 97, n° 2, p. 940-951. 2014.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperature, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews Food Science Food Safety**. v. 3, p. 1-20. 2004.

BOGA, H., and BRUNE, A. Oxygen reduction by homoacetogenic bacteria. **Abstracts Annual Meeting**. Verein. Allgem. Angewand. Mikrobiol. BioSpectrum. München, Abstract 15, p.143. 2000.

BOTELHO, A. M. Aumento da produção de biomassa de *Clostridium carboxidivorans* utilizando gás de síntese para fins biotecnológicos. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – **Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2016, 79f.

BUCKEL, W., THAUER, R. K. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na<sup>+</sup> translocating ferredoxin oxidation. **Biochimica and Biophysica Acta -Bioenergetics**, v. 1827, n° 2, p. 94-113, 2013.

CHEN, A. C., OHASHI, A., HARADA, H. Acetate synthesis from  $H_2/CO_2$  in simulated and actual landfill samples. **Environmental and Technology**. v. 24, p. 435–443. 2003.

COURTIN, M. G., and SPOELSTRA, S. F. A simulation model of the microbiological and chemical changes accompanying the initial stage of aerobic deterioration of silage. **Grass Forage Science**. v. 45, p.153-165. 1990.

Da SILVA, E. B., SAVAGE, R. M., POLUKIS, S. A., SMITH, M. L., GRAY, A. M., MESTER, R. N., and KUNG Jr. L. Effectiveness of a chemical additive on improving the aerobic stability of corn silage after short periods of ensiling. **Journal of Dairy Science**. 100(Suppl. 2):263 (Abstr.) 2017.

DANIEL, J. L. P., and NUSSIO, L. G. A simple and reliable system for measuring gas production kinetics during silage fermentation in lab scale silos. In: Daniel J.L.P., Morais G., Junges D. and Nussio L.G. (eds.) **Proceedings of the XVII International Silage Conference**, ESALQ, Piracicaba, Brazil, p. 576-577. 2015.

DAVIES, D. R. Silages inoculants – Where next? **Proceedings 14<sup>th</sup> International Symposium Forage conservation**, Brno, Czech Republic, p. 32-39. 2010.

DEVARAPALLI, M., ATIYEH, H. A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. **Biofuel Research Journal**. n° 7, p. 268-280. 2015.

DEWAR, W. A., McDONALD, P., and WHITTENBURY, R. The hydrolysis of grass hemicelluloses during ensilage. **Journal Science Food Agriculture**. V. 14, p. 411-417. 1963.

DINAMARCA, C. S. Homoacetogenic  $H_2$  consumption in fermentative hydrogen production processes. Ph.D. thesis. **Norwegian University of Science and Technology**, 2010.

DRAKE, H. L. and KÜSEL, K. How the diverse physiologic potentials of acetogens determine their in situ realities. In: Ljungdahl, L.G., Adams, M.W. Barton, L.L., Ferry, J.G. & Johnson, M.K. (eds.). **Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria**. New York, USA: Springer. p. 171-190. 2003.

DRAKE, H. L. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA “Wood/Ljungdahl” pathway: past and current perspectives. In: **Drake HL, editor. Acetogenesis**. New York: Chapman and Hall; 1994.

DRIEHUIS, F.; S. F. SPOELSTRA; S. C. J. COLE; R. AND MORGAN. Improving aerobic stability by inoculation with *Lactobacillus buchneri*. **Proceedings of the XI International Silage Conference**, IGER, Aberystwyth, p.106-107. 1996.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of applied Microbiology**. v. 95, p.1080-1086. 2003

FITZSIMONS, A., HOLS, P., JORE, J., LEER, R. J., O'CONNELL, M., DELCOUR, J Development of an amylolytic *Lactobacillus plantarum* silage strain expressing the *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase gene. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, nº 10, p. 3529-3535. 1994.

GARCIA, A. D., OLSON, W. G., OTTERBY D. E., LINN J. G., and HANSEN, W. P. Effects of temperature, moisture, and aeration on fermentation of alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**. v. 72, p. 93-103. 1989.

GUJER, W., ZEHNDER, A. J. B. Conversion processes in anaerobic digestion. **Water Science Technology**. v.15, p.127-167. 1983.

HORIUCHI, J., SHIMIZU, T., KANNO, T., KOBAYASHI, M. Dynamic behavior in response to pH shift during anaerobic acidogenesis with a chemstat culture. **Biotech Tech**. v. 13, p.155-167. 1999.

JOBIM, C. C., NUSSIO, L. G., REIS, R. A.; e SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, nº 36, p.101-120. 2007.

KIM, S. C. and ADESOGAN, A. T. Influence of ensiling temperature, simulated rainfall, and delayed sealing on fermentation characteristics and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 3122-3132. 2006.

KNICKY, M., WIBERG, H. G., EIDE, F. GERTZELL, B. Dynamics of gás formation during ensilage. In. Peter Udén; Torsten Eriksson; Bengt-Ove Rustas; Cecilia Müllar; Rolf Spröndly; Pauly Thomas. Proceedings of the 5th Nordic Feed Science Conference. Uppsala: Department of Animal Nutrition and Management, Swedish **University of Agricultural Sciences**. p. 41-46. 2014.

KOTSYURBENKO, O. R., FRIEDRICH, M. W., SIMANKOVA, M. V., NOZHEVNIKOVA, A. N., GOLYSHIN, P. N., TIMMIS, K. N. Shift from acetoclastic to  $H_2$ -dependent methanogenesis in a west siberian peat bog at low pH values and isolation of acidophilic methanobacterium strain. **Applied Environmental Microbiology**. v. 73, nº 7. p. 2344-2358. 2007.

KUNG Jr, L. Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment. **California alfalfa & forage symposium**, p. 1-2 December. 2010.

KUNG Jr., L. Potential factors that may limit the effectiveness of silage additives. In: **Proceeding XV International Silage Conference**, Madison, WI. p. 37-45. 2009



KUNG Jr., L., STOKES, M. R., LIN, C. J. Silage additives. In: Silage Science and Technology. Agronomy Monograph 42 (Eds Buxton D. R., Muck R. E., Harrison J. H.), **American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America**, Madison, p. 305–360. 2003.

LATIF, H., ZEIDAN, A. A., NIELSEN, A. T., ZENGLER, K. Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. **Current Opinion Biotechnology**. v. 27, p. 79-87. 2014.

LJUNGDAHL, L. G. The acetyl-CoA pathway and the chemiosmotic generation of ATP during acetogenesis. In: Drake H. L. (Ed) Acetogenesis. **Chapman and Hall**, New York. p. 63–87. 1994.

LJUNGDAHL, L. G., WOOD, H. G. Total synthesis of acetate from CO<sub>2</sub> by heterotrophic bacteria. **Annual review of Microbiology**. v. 23, p. 515-538. 1969.

LUO, G., KARAKASHEV, D., XIE, L., ZHOU, Q., ANGELIDAKI, I. Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 108. n° 8. p. 1816-1827. 2011.

McALLAN, A. B., and PHIPPS, R. H., the effect of sample date and plant density on the carbohydrate content of forage maize and the changes that occur on ensiling. **Journal Agriculture Science**. v. 89, p. 589-597. 1977.

McDONALD, P., HENDERSON, A. R., and WHITTENBURY, R. The effect of temperature on ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 17, p. 476-480. 1966.

McDONALD, P., HENDERSON, A. R., and HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publications. p. 340. 1991.

MUCK, R. E., MOSER, L. E., and PITT, R. E.. Postharvest factors affecting ensiling. In: D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison (Eds), Silage Science and Technology. Madison, WI: **American Society of Agronomy**. p. 251-304. 2003.

MUCK, R. E., and HOLMES, B. J. Factors affecting bunker silo densities. **Proceedings of the XII International Silage Conference, Uppsala, Sweden**, July 5-7, p. 278–279. 1999.

MUCK, R. E., and KUNG Jr., L. Effects of silage additives on ensiling. In Proc. Silage: Field to Feedbunk North American Conference. **NRAES-99. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY**. p. 187-199. 1997.

MUCK, R. E., and DICKERSON, J. T. Storage temperature effects on proteolysis in alfalfa silage. **Transactions of the ASAE**, n° 31, p. 1005-1009. 1988.



MUCK, R. E. Dry matter level affects alfalfa silage quality: Nitrogen transformations. *Transactions of the ASAE* v. 30, p. 7-14.1987

MUNASINGHE, P. C., KHANAL, S. K. Bio-mass-derived syngas fermentation into biofuels. **Biofuels**, v. 101, n° 13, p. 79-98. 2011.

NIE, Y. Q., LIU, H. E., DU, GUOCHENG., CHEN, J. I. Acetate yield increased by gas circulation and fed-batch fermentation in a novel syntrophic acetogenesis and homoacetogenesis coupling system. **Bioresour Technology**. v. 99, p. 2989-2995, 2008.

NIE, Y. Q., LIU, H. E., DU, GUOCHENG, CHEN, J. I. Enhancement of acetate production by a novel coupled syntrophic acetogenesis with homoacetogênesis process. **Process Biochemistry**. v. 42, p. 599-605. 2007.

NOVINSKI, C. O., da SILVA, E. P., RESTELATTO, R., PEREIRA, L. M., ZOPOLLATTO, M., SCHMIDT, P. Anaerobic respiration by epiphytic microbial in corn silage. In: **Anais da 53ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Gramado-RS. 2016.

OLIVEIRA, A. S., WEINBERG, Z. G., OGUNADE, I. M., CERVANTES, A. A. P., ARRIOLA, K. G., JIANG, Y., KIM, D., LI, X., GONÇALVES, M. C. M., VYAS, D., and ADESOGAN, D. A. T. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 100, p. 4587-4603. 2017.

PARAWIRA, W., MURTO, M., ZVAUYA, R., MATTIASSON, B. Anaerobic batch digestion of solid potato waste alone and in combination with sugar beet leaves. **Renewable Energy**. v. 29. p.1811-1823. 2004.

PITT, R. E. Silage and hay preservation. Northeast Regional Agricultural Engineering Service (NRAES), **Cooperative Extension, Ithaca**. 1990.

RYAN, P., MCHUGH, S., GOLDEN, T., COLLERAN, E. Investigation of homoacetogenesis bacterial activity during mesophilic, thermophilic and psychrophilic anaerobic digestion. **Proceeding of Environmental Science Association of Ireland (ESAI), University of Limerick**. 2005. p. 61-64. 2005.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.1, p. 1-20. 2013.

SANTOS, W. P., ÁVILA, C. L. S., PEREIRA, M. N., SCHWAN, R. F., LOPES, N. M., PINTO, J. C. Effect of the inoculation of sugarcane silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on feeding behavior and milk yield of dairy cows. **Journal of Animal Science**. v. 95, n° 10. p. 4613-4622. 2017.

SCHMIDT, P., NOVINSKI, C. O., CARNEIRO, E. W. and BAYER, C. Greenhouse gas emissions from fermentation of corn silage, In: Kuoppala, K., Rinne, M., & Vanhat-alo, A. (eds). **Proceedings of the XVI International Silage Conference, Hämeenlinna, Finland, 2012**, p. 448-449. 2012.

SCHMIDT, P., NUSSIO, L. G., QUEIROZ, O. C. M., SANTOS, M. C., ZOPOLLATTO, M., TOLEDO FILHO, S. G., DANIEL, J. L. P. Effects of *Lactobacillus buchneri* on the nutritive value of sugarcane silage for finishing beef bulls. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, nº 1, p. 8-13. 2014.

SCHEIRLINCK, T., DE MEUTTER, J., ARNAUT, G., JOOS, H., CLAEYSSSENS, M., MICHIELS, F. Cloning and expression of cellulose and xylanase genes. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 33, p. 534-541.1990.

STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M., ADELBERG, E. Mundo dos Micróbios. 1 Ed. São Paulo, SP: **Editora Edgard Blücher Ltda**, 741p, 1969.

SOUZA, C. M. Impacto ambiental da produção de silagens: Revisão da literatura e avaliação experimental em silos laboratoriais. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – **Universidade Federal do Paraná, Curitiba**, 2015, 132 f.

SZIKSZAY, M. Geoquímica das águas. **Boletim IG. USP, Série Didática** nº 5, Universidade de São Paulo, 34p. 1993.

TELLER, R. S., R. J. SCHMIDT, L. W. WHITLOW, and L. KUNG Jr. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p. 1428–1436. 2012.

TREMBLAY, P. L., ZHANG, T., SHABIR, A. D., LEANG, C., LOVLEY, D. R. The Rnf Complex of *Clostridium ljungdahlii* Is a Proton-Translocating Ferredoxin: NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase Essential for Autotrophic Growth. **mBio**, v. 4, nº 1, p. 406–412. 2012.

WANG, J., WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 34, nº 2, p. 799–811. 2009

WEINBERG, Z. G., MUCK, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS microbiology Reviews**. nº 19, p. 53-68. 1996.

WEINBERG, Z. G. and ASHBELL, D. G. Changes in gas composition in corn silages in bunker silos during storage and feed out. **Canadian Agricultural Engineering**. v. 36, p. 155-158. 1994.

WEINBERG, Z. G., SZAKACS, G., ASHBELL, G. and HEN, Y. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. **Journal Applied Microbiology**. v. 90, p. 561–566. 2001.

WEISSBACH, F. The future of forage conservation. In: II International Symposium on Forage Quality and Conservation: 2., São Pedro, 2011. **Proceeding... Piracicaba: FEALQ**, 2011, p. 319-363. 2011.

WIEGEL, J., TANNER, R., RAINEY, F. An introduction to the family Clostridiaceae. In: Dworkin M, editor. **The prokaryotes. New York: Springer**. p. 654-678. 2006.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effect of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 101-116. 1990.

ZHANG, F., DING, J., ZHANG, Y., CHEN, M., DING, Z. W., LOOSDRECHT, M. C. M., ZENG, R. J. Fatty acids production from hydrogen and carbon dioxide by mixed culture in the membrane biofilm reactor. **Water research**. v. 47. nº 16, p. 6122-6129. 2013.

ZHOU, Y., DROUIN, P., and LAFRANIÈRE, C. Effect of temperature (5-25 °C) on epiphytic lactic acid bacteria population and fermentation of whole-plant corn silage. **Journal of applied Microbiology**. v. 121, p. 657-671. 2016

ZOETEMEYER, R. J., VAN DEN HEUVEL, J. C., COHEN, A. pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester. **Water Research**. v. 16, p. 303.1982.

#### 4.0 CAPITULO I - EFEITO DE ADITIVOS BACTERIANOS SOBRE A QUALIDADE DE SILAGENS DE MILHO E DINÂMICA DA PRESSÃO INTERNA DE SILOS EXPERIMENTAIS

##### Resumo

A proposta desse trabalho foi avaliar o efeito de aditivos microbianos composto por bactérias heterofermentativas facultativas sobre a qualidade de silagens de milho e a dinâmica de produção de gases. Os silos experimentais utilizados foram equipados com dispositivo capaz de armazenar e medir os gases produzidos durante a fermentação permitindo ainda a aferição da pressão sem comprometer a anaerobiose na silagem. Ao total foram confeccionados 25 silos com  $5 \text{ kg} \pm 0,01$  de forragem fresca cada um. Os tratamentos foram: Row – bactérias homofermentativas  $2 \times 10^5 \text{ ufc g}^{-1}$  MV + enzimas; Sil-All – bactérias homofermentativas na concentração de  $1 \times 10^5$ ; Fire – bactérias homofermentativas na concentração de  $1 \times 10^5$  + enzimas + benzoato de sódio; Maize – bactérias homofermentativas na concentração de  $2,5 \times 10^5$ ; e Controle – sem adição de bactérias. Não houve efeito positivo dos aditivos sobre a qualidade da silagem, estabilidade aeróbia, produção de ácido láctico e AGVs e perdas de matéria seca. Houve maior preservação de proteína bruta na silagem tratada com o aditivo Row, muito embora não esteja claro se esse efeito ocorreu em razão do tratamento ou variação na qualidade da planta. A presença de enzimas fibrolíticas não alterou a fração FDN das silagens em relação ao Controle. A utilização de aditivos contendo BAL reduziu a produção de ácido butírico, propiônico e 1,2 propanodiol nas silagens. O aditivo Fire foi eficiente em controlar a população de leveduras e produção de etanol nas silagens tratadas, efeito atribuído ao benzoato de sódio presente nesse aditivo, contudo não houve melhoria na estabilidade aeróbia dessas silagens. A produção de gases foi influenciada mais pela ordem de ensilagem do que pelos aditivos. A pressão interna dos silos foi mensurada após 13 dias de ensilagem utilizando um manômetro de coluna de água com capacidade máxima de aferição de -1200 a +1200 mmCA. A pressão negativa nos silos foi negativamente correlacionada ( $r = -0,513$   $p < 0,05$ ) com o volume de produção de gás nas primeiras 12 horas. O manômetro de coluna de água pode ser usado para medir a pressão dos silos experimentais, porém líquidos mais pesados devem ser usados para alcançar a máxima amplitude.

Palavras-chave: dióxido de carbono, microbiologia, perdas de matéria seca, pressão negativa

## Abstract

The aim of this study was evaluated the effect of facultative heterofermentative bacteria on quality and dynamic of gas production of corn silage. As silos were used PVC tubes prepared to collect and measure the gas production as well the internal pressure. 25 silos were filled with  $\pm 5$  kg of fresh matter of forage. The treatment were: ROW homofermentative bacteria ( $2 \times 10^5$  CFU  $g^{-1}$  FM) + enzymes; Sil-All – homofermentative bacteria ( $1 \times 10^5$ ; Fire – homofermentative bacteria ( $1 \times 10^5$ ; Maize – homofermentative bacteria ( $2.5 \times 10^5$ ; and Control – No additive. No positive effect was noticed on silage quality, aerobic stability, lactic acid and VFA concentration, and dry matter losses. There was the higher preservation of crude protein when silage was inoculated, however, it is not clear if the effect was caused by treatment or quality variation *in nature* plant. The enzymes did not affect the NDF content when compared with Control. The additives composed of lactic acid bacteria (LAB) decreased the butyric acid, propionic acid, and 1,2 propanediol concentration in corn silage. The silage treated with Fire additive showed lower yeast count and ethanol concentration, an effect assigned by the presence of sodium benzoate, however, no aerobic stability improvement was reached. The effect on the gas production was attributed to the sequence of the ensiling than the additives impact. The internal pressure was measured after 13 days of ensiling by Tube-U water manometer with -1200 to 1200 range capacity. The negative pressure inside the silos was correlated ( $r = -0.513$   $P < 0.05$ ) with the total gas production in the first 12 hours. The column water manometer appears to be useful for measuring the pressure in the lab silos, but the heavy liquid should be applied to determine the final value. After fermentative phase, the negative pressure inside the silos may occur by the mass accommodation into the silos, but others possibilities need to be evaluated.

Key-word: dioxide of carbon, microbiology, dry matter losses, negative pressure

## 4.1 INTRODUÇÃO

As variáveis mais usadas para avaliar o padrão fermentativo de silagens incluem pH, concentração de ácidos graxos voláteis, álcool e a população microbiana na abertura. Mais recentemente, a coleta, mensuração e análise dos gases produzidos durante a fermentação estão sendo utilizadas como parâmetros complementares (Schmidt et al., 2012). Em uma fermentação ideal as bactérias homoláticas utilizam carboidratos solúveis como substrato para produção exclusiva de ácido láctico. Como resultado desse metabolismo há poucas perdas de MS e energia (Pahlow et al., 2003). No entanto, a dinâmica de fermentação de forragens é complexa e envolve um grande número de microrganismos.

As mais antigas e mais usadas bactérias para inoculação em silagens são as BAL homofermentativas. Hoje, no entanto, muitos microrganismos desse grupo são reclassificados como BAL heterofermentativos facultativas (Pahlow et al., 2003). As BAL heterofermentativas facultativas (ex. *L. plantarum*) fermentam hexoses, assim como as homofermentativas obrigatórias (ex. *L. acidophilus* e *L. salivarius*), quase que exclusivamente em ácido láctico. As BAL heterofermentativas facultativas distinguem das homofermentativas obrigatórias por apresentarem a enzima fosfoquetolase. Essa característica fornece a essas bactérias a capacidade de fermentar pentoses produzindo ácido láctico e ácido acético. Os representantes desse grupo incluem *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium* e várias espécies de *Pediococcus*. Silagens tratadas com essas bactérias normalmente apresentam menor valor de pH, ácido acético e ácido butírico e maior concentração de ácido láctico (Muck e Kung, 1997). Porém uma recente meta análise revelou que o tipo do material ensilado pode alterar o efeito desses inoculantes (Oliveira et al., 2017). Essa revisão mostrou que houve redução do pH em silagens de gramíneas temperadas e tropicais, alfafa e algumas leguminosas, mas não em silagens de milho e sorgo.

Os aditivos de silagens podem ser divididos em 4 categorias: 1) estimulantes de fermentação; 2) inibidores de fermentação; 3) inibidores de deterioração aeróbica 4) materiais secos usados como absorvente do excesso de água (McDonald et al., 1991; Kung et al., 2003). Essas categorias foram

criadas em função do tipo de ação na silagem e algumas vezes o mesmo aditivo pode ser classificado em duas classes distintas. Dessa forma, a categoria estimulantes de fermentação podemos subdividir em bactéria ácido lácticas (BAL) homofermentativas, BAL heterofermentativas obrigatórias, combinação de inoculantes com BAL heterofermentativas obrigatórias e homofermentativas ou BAL facultativas heterofermentativas, outros inoculantes (outras bactérias que não BAL), substratos (melaço, açúcares) e enzimas (Kung et al., 2003).

Por décadas as avaliações dos aditivos bacterianos se concentraram em repetir ensaios utilizando os grupos de bactéria homo e heteroláticas selecionados provenientes das mesmas regiões, implicando em grande variação de resultados.

Parte da falta de resultados consistentes nos experimentos com essas bactérias se deve a condições adversas as quais as silagens são submetidas (Weiss et al., 2016; Weinberg et al., 2001) principalmente variação ambiental. Nesse sentido, a identificação e seleção de microrganismos endêmicos de determinadas regiões começaram a despertar interesse dos pesquisadores (Ávila et al., 2009; Silva et al., 2014; Santos et al., 2015)

O objetivo desse trabalho foi avaliar aditivos microbianos comerciais sobre a composição química, perdas e pressão interna dos silos experimentais.



## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Centro de Pesquisas em Forragicultura (CPFOR) na Fazenda Experimental Canguiri - Universidade Federal do Paraná em Pinhais/PR. A formação da lavoura foi realizada em 05/11/2014 com o híbrido Biomatrix 2B655HX (Dow AgroScience) e a ensilagem ocorreu em 05/03/2015, quando as plantas apresentavam 278,4 g MS kg<sup>-1</sup>.

A forragem foi picada utilizando picadora estacionária regulada para processamento teórico de partículas de 10 mm.

Como tratamentos foram utilizados combinações de diferentes bactérias (Lallemand Animal Nutrition), compondo quatro aditivos: ROW: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* com quantidade final inoculada de 2 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV de forragem e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas. Sil-All: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* com quantidade final inoculada de 1 x 10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> de MV de forragem ensilada. FIREGUARD: *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* com quantidade final inoculada de 1 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV de forragem e enzimas amilase, xilanase, β glucanase e benzoato de sódio. MAIZE-ALL: composto pelos seguintes microrganismos: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* com quantidade final inoculada de 2,5 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV de forragem. E o tratamento CONTROLE sem aditivo. Todos os inoculantes foram diluídos em 100 ml de água destilada e aplicados utilizando borrifador manual. No tratamento controle foram aplicados somente 100 ml de água destilada.

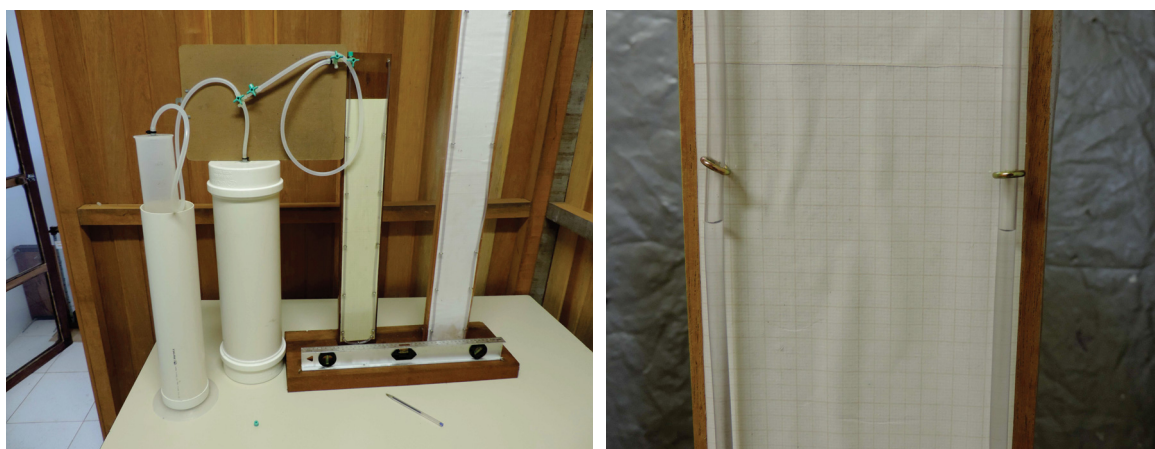
### 4.2.1 Sistema de coleta de gases e medição de pressão

Como silos experimentais foram utilizados tubos de PVC com 150 mm de diâmetro e 50 cm de altura com volume útil total de 8,48 L. Os silos foram equipados com aparato para mensuração de gases produzidos durante a fase fermentativa segundo metodologia descrita por Souza (2015). Os registros do volume de gás produzido foram realizados durante 84 horas consecutivas. Os



intervalos de leituras eram determinados conforme a velocidade de produção, uma vez que o sistema desenvolvido apresenta limitação na capacidade de armazenamento (1 litro), o que torna necessário o esvaziamento frequente para que não haja vazamento e perda dos gases.

A utilização de silos hermeticamente fechados, além de permitir a coleta total dos gases, possibilita determinar a pressão no interior do recipiente. Para isso foi desenvolvido um manômetro modelo coluna de água para medir a pressão dentro dos silos. Esse modelo de equipamento é capaz de determinar pressões baixas, tanto positivas quanto negativas. No presente ensaio foi determinada somente a pressão negativa, uma vez que a pressão positiva, caracterizada pela produção e expulsão do gás, não foi determinada. Para a construção do manômetro foi utilizada uma régua de madeira (posicionada verticalmente) com 1,8 metros de altura com graduação milimétrica em toda sua extensão. Nas laterais opostas foi fixado um tubo flexível de plástico com diâmetro de 4 mm em forma de “U” que posteriormente foi preenchido com água até a altura de 90 cm (Figura 5).



**FIGURA 5.** VISÃO GERAL DO MANÔMETRO DE COLUNA DE ÁGUA E DETALHE DO NÍVEL DA ÁGUA NO INTERIOR DOS TUBOS

Na extremidade do tubo foi acoplada uma válvula para permitir a ligação do manômetro com o sistema dos silos experimentais sem risco de vazamentos ou entrada de ar atmosférico. As leituras foram realizadas a cada três dias após o término da fase de produção de gás (pressão positiva) (10 dias pós

ensilagem) e permaneceram com o mesmo intervalo de leituras até a abertura, aos 93 dias.

#### 4.2.2 Ensilagem e tratamentos

Os tratamentos foram preparados individualmente e somente após o término da ensilagem e limpeza dos equipamentos novas plantas eram processadas para o tratamento seguinte. A montagem de experimentos com silagens são complexos, trabalhosos e lentos. Do preparo da forragem até o enchimento e vedação do silo experimental leva-se muito tempo, podendo ser essa uma causa de variação entre os tratamentos. Essa demora está entre as principais limitações nos ensaios avaliando aditivos em silagens e não há uma metodologia ou uma forma para anular esse efeito. Diante dessa questão adotamos a seguinte ordem de ensilagem dos tratamentos: 1º. ROW; 2º. SIL ALL; 3º. FIREGUARD; 4º. MAIZE; 5º. CONTROLE, na tentativa de anular qualquer efeito positivo sobre o tratamento controle e penalização nos tratamentos com aditivos. Foram coletadas duas amostras por tratamento para determinação do teor de MS, pH e composição química. Para a análise microbiológica da forragem foram coletadas amostras do material picado do primeiro e do último tratamento, antes da aplicação do aditivo.

Anteriormente ao enchimento e compactação da forragem, 5 porções de 5,400 kg de material foram pesados e distribuídos separadamente em local limpo. Cada uma dessas frações, que representava uma repetição do tratamento, foi totalmente compactada no silo experimental. Esse procedimento foi adotado para manter a mesma densidade para todos os silos ( $637 \pm 3 \text{ kg MV m}^{-3}$ ). A forragem foi compactada com auxílio de um bastão de madeira protegido na extremidade com saco plástico que foi trocado a cada tratamento.

Os silos ficaram armazenados por 93 dias em sala com temperatura controlada a  $24,2 \pm 3^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.3 Abertura dos silos e determinação de perdas fermentativas

Anteriormente à abertura, os silos foram pesados para determinação das perdas fermentativas, como descrito por Jobim et al. (2007). A desensilagem foi realizada manualmente e o material retirado depositado em sacos plásticos (individuais e identificados) para homogeneização e coleta de amostras para as análises.

As amostras de silagem de todos os silos foram coletadas pelo mesmo avaliador. Após a homogeneização manual o responsável realizava a coleta de 5 subamostras para compor a porção final, que era subdividida em duas amostras, que foi destinada para as análises químicas e físicas.

Os cálculos de perdas de MS durante o armazenamento foram realizados utilizando as fórmulas descritas por Jobim et al. (2007).

#### 4.2.4 Coleta e processamento das amostras

As análises da composição química das amostras foram realizadas pelos seguintes métodos: Proteína Bruta, pelo método de DUMAS; Matéria Mineral (MM) e Matéria Seca (MS), pelo método descrito por Silva e Queiroz (2002); Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Fibra em Detergente Ácido (FDA), pelo método sequencial ANKOM, descrito por Holden (1999).

Para determinação do conteúdo de MS, duas porções de  $\pm 300$  g de amostra úmida foram coletadas de cada repetição e mantidas até peso constante em estufa de circulação forçada a 65°C, e revolvidas uma vez ao dia. Após a determinação do teor de MS essas amostras foram misturadas para compor uma única porção que foi encaminhada para moagem. O processamento das amostras foi realizado em moinho (modelo – MA580, Marconi) utilizando peneira com crivos de 1 mm. Uma segunda secagem foi realizada a 105°C para determinar a umidade residual e correção dos valores da composição química (Silva e Queiroz, 2002). Outras duas amostras de silagem úmida de  $\pm 50$  g cada foram coletadas para avaliação de pH, microbiologia e concentração de compostos voláteis (COV). Para avaliação de pH, 25 g de amostra foi agitada por 1 minuto em água destilada e a leitura

realizada na sequência com pHmetro digital (PG 1400, Gehaka). Após a leitura, a mistura (amostra+água) foi processada em liquidificador por 1 minuto em velocidade máxima. Ao término, o suco foi filtrado em gaze dupla e depois em filtro de papel Wattman 54. Após a última filtração uma fração de 2 mL foi coletada e armazenada em tubos Eppendroff e imediatamente congelada. As análises de COV foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, conforme metodologia descrita por Daniel et al. (2013).

#### 4.2.5 Plaqueamento e contagem microbiológica

O plaqueamento para contagem de bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos foram realizadas no mesmo dia, no fechamento e na abertura do experimento, no laboratório do CPFOR. Em 225 mL de solução Ringer, autoclavada no dia anterior, uma porção de 25 g de amostra foi homogeneizada por 4 minutos em agitador de pás tipo Stomacher (MA440/CF, Marconi) à velocidade de 150 rpm. Ao término da agitação a solução foi filtrada em gaze com três camadas. A partir do filtrado foram realizadas diluições sequenciais em caldo MRS (MRS Broth ACC – Rogosa e Sharpe, Merck) para crescimento de BAL, e solução Ringer para contagem de leveduras e fungos. As diluições ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) em caldo MRS foram plaqueadas em placas Petrifilm (AC, 3M<sup>®</sup>) e alocadas em jarra de cultivo de microrganismos contendo disco gerador de anaerobiose (anaerobac, Probac). A jarra foi mantida em estufa a 30°C e a contagem da população foi realizada 48±4h após a incubação. As diluições ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) em solução Ringer foram plaqueadas em placas Petrifilm (YM, 3M<sup>®</sup>) e incubadas em estufa de cultura com temperatura média de 23,5°C por 72h, para contagem sequencial de leveduras, e 120h, para contagem de fungos.

#### 4.2.6 Estabilidade aeróbica pós-abertura

Após todas as amostras coletadas, as silagens remanescentes nos sacos plásticos (identificados) foram submetidas à avaliação de estabilidade em aerobiose por 240 horas. Uma porção de 3 kg de silagem de cada repetição foi

acondicionada, sem compactação, em baldes plásticos individuais e mantidos em sala com temperatura controlada ( $25^{\circ}\pm 2$  C). Um termômetro eletrônico registrador (datalogger EL-USB, Lascar), programado para registro automático da temperatura a cada 30 minutos, foi inserido no centro da massa em cada balde e outro foi mantido no interior da sala. Ao final do período de avaliação os baldes foram pesados e todo o material colocado em sacos plásticos individuais para homogeneização. A amostragem em 5 pontos diferentes foi usada para compor a amostra final para determinação do teor de MS e cálculo de perdas totais durante a estabilidade em aerobiose. A elevação da temperatura em  $2^{\circ}\text{C}$  em relação ao ambiente foi utilizada para determinar o intervalo de tempo em que houve o início da degradação da silagem. Outras variáveis calculadas para determinar o tempo de preservação da silagem pós-abertura foram a temperatura acumulada ( $T_{\text{acum}}$  = definida como a soma das temperaturas da silagem menos a temperatura ambiente), temperatura máxima registrada ( $T_{\text{max}}$ ) e tempo para atingir a  $T_{\text{max}}$ .

Além das variáveis de temperatura, a avaliação do pH ao longo do período de exposição aeróbia da silagem também foi realizada. Para cada repetição, um balde “irmão” foi preparado para amostragens a cada dois dias e mensuração do pH em extrato aquoso. Dessa forma, foi possível fazer uma curva de evolução do pH durante os 10 dias de ensaio.

#### 4.2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento para testar a diferença entre os tratamentos foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 5 repetições, totalizando 25 unidades experimentais.

Os dados brutos foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variância foi avaliada e corrigida, quando necessário, pelo método Box-Cox.

As variáveis que apresentaram diferença significativa com probabilidade de erro menor que 5% na análise de variância (ANOVA) foram submetidas ao teste de comparação de médias de Tukey (5% de significância).

O software utilizado para realização da análise estatística foi o JMP<sup>®</sup> pro 13.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de composição química, pH e teor de matéria seca da forragem original, para os diferentes tratamentos, estão apresentados na Tabela 1. Para melhor apresentação e comparação dos resultados a ordem dos tratamentos está em ordem inversa de ensilagem. Embora não haja comparação experimental entre tratamentos é possível perceber um aumento nos teores de MS, MM e pH da forragem entre o primeiro (Row) e o último (Controle) tratamento ensilado e pequenas reduções nos conteúdos de FDN, FDA e proteína bruta.

**TABELA 1:** COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DO MILHO ANTES DA ENSILAGEM

Variáveis <sup>2</sup>	Tratamentos <sup>1</sup>						DP <sup>3</sup>
	Controle	Maize	Sil	Fire	Row	Média	
Matéria Seca, g kg	280	281	279,7	275,2	273,5	278,3	0,41
MM, g kg <sup>-1</sup> MS	35,2	33,9	34,5	33,8	32	33,9	0,11
Proteína bruta, g kg <sup>-1</sup> MS	54,6	58	62,8	61,9	63,5	60,2	0,42
FDN, g kg <sup>-1</sup> MS	538	564	540	566	573	556	1,66
FDA, g kg <sup>-1</sup> MS	241	262	257	275	254	257,8	1,21
pH	6,06	5,95	5,88	5,87	5,90	5,92	0,10

<sup>1</sup>**ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas. **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $1 \times 10^6$  ufc/g de MV). **FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase,  $\beta$  glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2,5 \times 10^5$  ufc/g MV). **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup>MS= Matéria seca; MM= matéria mineral; FDN= Fibra em detergente neutro; FDA= Fibra em detergente ácido,

<sup>3</sup>DP – Desvio padrão

Possivelmente, a ordem de ensilagem dos tratamentos pode ter influenciado essas variáveis, pois a plantas de milho foram colhidas ao mesmo tempo. A diferença de três horas entre o início e o fim da ensilagem aparenta ser uma importante fonte de variação, desconsiderada por muitos pesquisadores. Normalmente a picagem das plantas para ensilagem é realizada de uma única vez e dessa pilha são retiradas as porções para a preparação dos tratamentos. Além disso, a forma e a frequência de coleta de amostras não são detalhadamente explicadas nos artigos. Entende-se que a coleta de amostra para determinar a qualidade da forragem (*in natura*) é feita logo no início das

atividades e em uma única amostragem que representa o todo (Skonieski et al., 2017; Sucu et al., 2016). Rotineiramente os ensaios com aditivos em silagens, os trabalhos são iniciados pelo tratamento controle para evitar a contaminação pelos outros tratamentos. No entanto, seguindo esse raciocínio lógico, a qualidade da forragem do primeiro tratamento ensilado pode ser diferente do último tratamento e a comparação dos resultados entre tratamentos pode ser equivocada.

Essa fonte de variação pode gerar interpretação errada de algumas variáveis ao final do experimento. Neste ensaio, o tempo de confecção dos tratamentos demonstra ser a causa de variação em algumas características químicas da silagem. Podemos afirmar que o tratamento Row preservou maior quantidade de PB ( $P < 0,05$ ) na silagem em relação ao controle (64,3 e 59,2 g kg<sup>-1</sup> MS, respectivamente, Tabela 3). Porém, os teores desse composto já eram diferentes na ensilagem, muito embora, as plantas tenham sido colhidas da mesma área e ao mesmo tempo. A variação na composição química pode ser resultado da proteólise enzimática da planta que permaneceu mais tempo exposta (Fairbairn et al., 1992).

Da mesma forma, a contagem microbiológica foi realizada em duplicata e na mesma sequência das coletas anteriores. O resultado do plaqueamento dessas amostras está apresentado na Tabela 2. É possível perceber aumento na população de BAL entre a amostra 1 e amostra 2 (6,83 e 7,43 log UFC/g). A contagem de leveduras e fungos filamentosos foi próxima entre as amostragens. Muito embora, não tenha sido delineado um experimento para avaliar os efeitos do intervalo da ensilagem sobre as características da silagem, podemos sugerir que mesmo um curto espaço de tempo (3 horas no presente ensaio) é uma importante causa de variação.

**TABELA 2:** POPULAÇÃO EPIFÍTICA DO MILHO PRÉ-ENSILAGEM COM DOIS INTERVALOS DE COLETA DE AMOSTRA

Variáveis	Sequência de coletas <sup>1</sup>	
	Amostragem 1	Amostragem 2
BAL, log UFC/g	6,83	7,43
Leveduras, log UFC/g	5,48	5,36
Fungos filamentosos, log UFC/g	5,38	5,35

<sup>1</sup> Amostragem 1: amostras coletadas no início da ensilagem logo após a picagem das primeiras plantas; Amostragem 2: coleta de amostra realizada momentos antes de ensilagem do último tratamento, logo após a picagem das últimas plantas.



A população de BAL epifítica na Amostra 1 (coletada no início do experimento) é condizente com as contagens para esse tipo de forragem (Driehuis et al., 1999). Muito embora boa parte das bactérias do ácido láctico sejam anaeróbicas estritas (McDonald et al., 1991), após a colheita da planta e em condições aeróbicas é possível observar aumento na população desses organismos (Uriarte-Archundia et al., 2002), possivelmente pelo crescimento de espécies microaerófilas (Klein et al., 1998). A presença de leveduras e fungos filamentosos apresentou valores similares a outros trabalhos com ensilagem de milho no Brasil (Basso et al., 2012) e não sofreu alteração devido ao tempo de espera para ensilagem.

Houve efeito dos aditivos sobre a composição química das silagens em comparação ao controle, conforme apresentado na Tabela 3. As silagens tratadas com os aditivos Sil e Maize apresentaram maiores concentrações de MS ( $P < 0,05$ ) em relação ao aditivo Fire e menor teor de MM em comparação aos demais tratamentos. O teor de proteína bruta foi menor ( $P < 0,05$ ) na silagem Controle em relação a silagem tratadas com o aditivo Row. A utilização do aditivo Maize promoveu aumento no conteúdo de FDN ( $P < 0,05$ ) quando comparado com os aditivos Row, Fire e tratamento Controle. As demais variáveis não apresentaram diferenças.

**TABELA 3:** COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DA SILAGEM DE MILHO APÓS 93 DIAS DE ARMAZENAMENTO

Variáveis <sup>2</sup>	Tratamento <sup>1</sup>					EPM <sup>3</sup>
	Controle	Maize	Fire	Sil	Row	
Matéria Seca, g <sup>-1</sup> kg	287,2 <sup>ab</sup>	297,9 <sup>a</sup>	283,3 <sup>b</sup>	295,4 <sup>a</sup>	287 <sup>ab</sup>	0,25
MM, g <sup>-1</sup> kg	34,7 <sup>a</sup>	33,1 <sup>b</sup>	35,8 <sup>a</sup>	31,2 <sup>b</sup>	34,8 <sup>a</sup>	0,07
Proteína bruta, g <sup>-1</sup> kg	59,2 <sup>b</sup>	62,3 <sup>ab</sup>	62,5 <sup>ab</sup>	61,1 <sup>ab</sup>	64,3 <sup>a</sup>	0,08
FDN, g <sup>-1</sup> kg	506 <sup>b</sup>	610 <sup>a</sup>	501 <sup>b</sup>	542 <sup>ab</sup>	510 <sup>b</sup>	1,65
FDA, g <sup>-1</sup> kg	240	246,2	249	254,6	246,4	0,46
pH	3,81	3,87	3,83	3,82	3,81	0,01
Perdas totais de MS, %	-0,92	-5,11	-2,89	-2,89	-3,95	0,94
Perdas MS <sub>corr105</sub> , %	0,9	-3,2	-0,8	-3,2	-2,3	1,05

Médias com letras diferentes na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância.

<sup>1</sup>**ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas. **Sil-All:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $1 \times 10^6$  ufc/g de MV). **FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase,  $\beta$  glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2,5 \times 10^5$  ufc/g MV). **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup> MS<sub>corr</sub>= Matéria seca corrigida, amostras secas em estufa a 105 °C; MM= matéria mineral; FDN= Fibra em detergente neutro; FDA= Fibra em detergente ácido

<sup>3</sup> Erro padrão da média



O maior teor de PB apresentado no tratamento Row em comparação ao Controle poderia ser explicado pela menor proteólise durante a fase fermentativa. Segundo McDonald et al. (1991) a proteólise se estende durante a fermentação enquanto as condições do meio permitir atividade microbiana e enzimática da planta. Dessa forma, poderíamos supor que a utilização do aditivo bacteriano promoveu a redução do pH de maneira mais rápida e interrompeu toda a atividade enzimática. No entanto, com base na análise dos teores de PB na forragem original de cada tratamento sabemos que desde o início esses valores são diferentes. A avaliação de  $N-NH_3$  nas amostras poderia fornecer informações para confirmar essa hipótese, contudo essa avaliação não foi realizada.

Apesar da presença de enzimas fibrolíticas (celulases, hemicelulase e xilanases) nos aditivos Row e Fire não houve diferença no teor de FDN entre as silagens tratadas com esses aditivos e as silagens Controle. A utilização de enzimas em silagens de milho, para degradação da fração fibrosa, encontra muitos desafios. A principal dificuldade é a manutenção de condições ótimas para esses tipos de enzimas, que requerem pH de 4,5 e temperatura de 50°C, condições dificilmente encontradas em silagens.

Kung et al. (1991) justificam o uso de enzimas por duas razões principais. Primeiro: essas enzimas podem degradar parcialmente a parede celular da planta (celulose e hemicelulose), aumentando a disponibilidade de carboidratos solúveis na massa ensilada, e assim as BAL podem ter substrato extra para fermentar e levar o pH a níveis menores mais rapidamente. Contudo, isso não justifica a utilização na ensilagem de milho, devido a concentração ideal de substratos para as bactérias (McDonald et al., 1991). Segundo: a digestão parcial da parede celular pode melhorar a taxa e/ou extensão da digestibilidade. Efeito não observado no tratamento Maize que apresentou maior fração de FDN comparado com Controle, Fire e Row. Um fato que chama a atenção é que enquanto todas as silagens tiveram redução no teor de FDN, em relação a forragem *in natura*, a silagem do tratamento Maize aumentou em 8% essa fração. Essa variação pode ser explicada por erro de amostragem.

Nos últimos anos um achado interessante vem se repetindo nos experimentos realizados pelo Centro de Pesquisa em Forragicultura da Universidade Federal do Paraná - CPFOR. As estimativas de perdas de MS

durante a fermentação apresentam valores negativos, ou seja, ao invés de haver diminuição na quantidade de MS os silos acabam ganhando peso (Souza, 2015; Novinski et al., 2016). Muito embora esse evento seja um achado frequente em ensaios com silagens, os pesquisadores ignoram esse fato e acabam retirando os valores das análises, por considerarem erro experimental. Devido à repetição em nossos experimentos, em particular nesse que todas as repetições de todos os tratamentos apresentaram valores negativos, vamos manter e discutir esses dados. Embora comum raramente os valores negativos de perdas em silagens de milho são apresentados e/ou discutidos. Podemos sugerir que a perfeita vedação dos silos leva a perdas fermentativas mínimas e devido a imprecisão dos métodos empregados, esses valores negativos podem aparecer. Apesar de não haver efeito estatístico, as silagens não tratadas foram as únicas que apresentaram perdas positivas após correção dos valores para MS 105°C, muito embora com valores baixos (0,9%).

A fixação biológica do CO<sub>2</sub> na silagem, mediada por atividade de organismos homoacetogênicos poderia justificar o incremento de MS nas silagens, porém esse não foi foco do presente ensaio. O fato é que perdas negativas são verificadas, porém raramente apresentadas e pouco discutidas.

Conforme demonstrado na Tabela 4, houve efeito entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ) para ácido láctico e compostos voláteis. O tratamento Maize apresentou menor concentração de ácido láctico em comparação aos tratamentos Controle e Fire, assim como menor produção de ácido acético em relação ao Sill-All. O ácido propiônico apresentou maior teor ( $P < 0,05$ ) nas silagens Controle e Row. Os inoculantes microbianos tiveram efeito positivo na redução do ácido butírico e 1,2 propanodiol em relação à silagem não tratada. O aditivo Fire foi o único que reduziu a produção de etanol entre todas as silagens avaliadas.

**TABELA 4:** COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E ÁCIDO LÁTICO EM SILAGEM DE MILHO

Variáveis	Tratamento <sup>1</sup>					
	Controle	Maize	Fire	Sil	Row	EPM <sup>2</sup>
Ácido lático, g kg <sup>-1</sup> MS	47,6 <sup>a</sup>	41,5 <sup>b</sup>	47,5 <sup>a</sup>	44,8 <sup>ab</sup>	46,4 <sup>ab</sup>	0,12
Ácido acético, g kg <sup>-1</sup> MS	12,6 <sup>ab</sup>	12,4 <sup>b</sup>	12,8 <sup>ab</sup>	13,7 <sup>a</sup>	13,5 <sup>ab</sup>	0,03
Ácido propiônico, g kg <sup>-1</sup> MS	2,1 <sup>a</sup>	1,2 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>	1,5 <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup>	8,35
Ácido butírico, g kg <sup>-1</sup> MS	4,3 <sup>a</sup>	1,5 <sup>b</sup>	1,9 <sup>b</sup>	2,0 <sup>b</sup>	2,4 <sup>b</sup>	3,16
1,2 Propanodiol, mg kg <sup>-1</sup> MS	593 <sup>a</sup>	204 <sup>c</sup>	329 <sup>b</sup>	121 <sup>d</sup>	158 <sup>cd</sup>	19
Etanol, g kg <sup>-1</sup> MS	5,8 <sup>a</sup>	5,8 <sup>a</sup>	3,3 <sup>b</sup>	5,1 <sup>a</sup>	5,6 <sup>a</sup>	0,29

Médias com letras diferentes na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância.

<sup>1</sup>**ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2 x 10<sup>5</sup> ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas. **Sil-All:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (1 x 10<sup>6</sup> ufc/g de MV). **FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* (1 x 10<sup>5</sup> ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase e β glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2,5 x 10<sup>5</sup> ufc/g MV). **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup> Erro padrão da média

A utilização de inoculantes contendo BAL não promoveu aumento na concentração de ácido lático nas silagens tratadas, uma vez que nenhuma silagem apresentou valores mais altos desse ácido que a silagem Controle. Esse resultado mostra que as bactérias epifíticas, no tratamento controle, apresentaram elevada atividade e conseguiram manter um bom padrão fermentativo.

O ácido butírico não deveria estar presente em silagens bem preservadas. A presença desse ácido indica o metabolismo de bactéria do gênero *Clostridium*, cuja atividade representa elevadas perdas de MS e energia (Pahlow et al., 2003). Os clostrídios presentes nas silagens são descritos em três principais formas: capazes de fermentar açúcar em ácido butírico (sacarolíticos), os que podem converter ácido lático para ácido butírico, e um terceiro grupo utiliza proteína (proteolíticos) como substrato (McDonald et al., 1991). No entanto, a atividade dos clostrídios capazes de utilizar a via acetogênica sempre foi ignorada em avaliações com silagens.

Silagem com alta concentração de ácido butírico apresenta pH mais elevado, menor concentração de ácido lático e maior de ácido acético, todavia, nenhum desses efeitos foi observado no tratamento Controle. No entanto, a maior concentração de ácido propiônico associado à presença de ácido butírico na silagem controle indica atividade de *Clostridium propionicum*. O ácido propiônico em silagens de milho é encontrado em concentrações menores que 1 g kg<sup>-1</sup> MS (Krooneman et al., 2001), porém neste ensaio a silagem Controle

apresentou duas vezes mais. A maior concentração ( $P < 0,05$ ) de 1,2 propanodiol (1,2 PD) na silagem Controle associada ao teor de ácido butírico reforça a afirmação de moderada atividade de Clostrídios neste tratamento, muito embora outros microrganismos possam produzir esse composto (Suzuki e Onishi, 1968; Sanchez et al., 1968). A presença de 1,2 PD também pode ser atribuída à atividade de *L. buchneri*, principalmente se o período de armazenamento da silagem for maior que 30 dias, uma vez que o mecanismo de degradação do ácido láctico à esse composto não está completamente ativado antes desse período (Oude Elferink et al., 2001).

O benzoato de sódio presente na composição do aditivo Fire pode explicar a redução na produção de etanol encontrada neste tratamento. Os efeitos benéficos desse aditivo foram apontados por Kleinschmit et al. (2005); e Knický e Spörndly, (2009), e entre eles está a redução no teor de etanol das silagens. Mesmo com essa redução, os valores encontrados nesse experimento estão abaixo dos teores normalmente relatados para esse tipo de silagem (Hafner et al., 2010; Kung e Shaver, 2001). Teores de etanol acima de 3% estão associados com alta população de leveduras ( $> 6 \text{ ufc g}^{-1} \text{ MV}$ ) e consequentemente menor estabilidade quando exposta ao oxigênio. Essa situação pode ser agravada na presença do ácido láctico, que é assimilado por algumas leveduras para seu crescimento.

Os resultados de estabilidade aeróbia estão apresentados na Tabela 5. Nenhum dos aditivos melhorou a estabilidade aeróbia das silagens em comparação ao Controle. Porém, silagens tratadas com o aditivo Fire apresentaram maior estabilidade em aerobiose (71,6 horas) em comparação aos tratamentos Maize (27,8 horas) e Row (41,1 horas). As variáveis Tmax e perdas durante a estabilidade não sofreram influência dos aditivos.

**TABELA 5: AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE AERÓBIA EM SILAGENS DE MILHO**

Variáveis <sup>1</sup>	Tratamento <sup>2</sup>					EPM <sup>3</sup>
	Controle	Maize	Fire	Sil	Row	
EA, Horas	44,6 <sup>ab</sup>	27,8 <sup>b</sup>	71,6 <sup>a</sup>	49,6 <sup>ab</sup>	41,1 <sup>b</sup>	6,16
Tmax, horas	38,1	38	33,2	38,3	37,3	1,70
Perdas EA, %	16,3	15,6	16,4	16,1	14,8	0,63

Médias com letras distintas na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup> EA = estabilidade aeróbia; Tmax = temperatura máxima alcançada pela massa; Perdas EA = perdas de MS após 240 horas de exposição.

<sup>2</sup> **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas. **Sil-All:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $1 \times 10^6$  ufc/g de MV). **FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase e  $\beta$  glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2,5 \times 10^5$  ufc/g MV). **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>3</sup> Erro padrão da média

A menor estabilidade aeróbia observada no tratamento Maize pode estar relacionada com a menor concentração de ácido propiônico ( $1,2 \text{ g kg}^{-1}$  MS). Esse ácido apresenta características antifúngicas (McDonald et al., 1991) e pode restringir o crescimento de leveduras em pH baixos (<4). Assim, a baixa presença de ácido propiônico na silagem tratada com o aditivo Maize pode explicar a maior população de leveduras (Tabela 6) e consequentemente menor estabilidade aeróbia.

A silagem tratada com aditivo contendo bactérias heterofermentativas e benzoato de sódio (Fire) apresentou melhor estabilidade pós abertura quando comparada com as silagens Row e Maize, mesmo que essa contenham 2 vezes mais unidades formadoras de colônias.

A baixa contagem de leveduras nas silagens tratadas com o aditivo Fire (Tabela 6) não ocasionou aumento da estabilidade em aerobiose comparado com o Controle, isso porque, apesar das leveduras apresentarem uma importância para o início de processo de degradação da silagem, outros microrganismos podem desencadear essa ação. Spoelstra et al. (1988) relataram que a presença de *Acetobacter ssp.* poderia acelerar a degradação de silagens expostas ao ar pela oxidação do etanol para acetato ou pela oxidação do ácido láctico e acetato para  $\text{CO}_2$  e água. Portanto, a baixa contagem de leveduras em silagem não significa alta estabilidade pós-abertura e o uso de aditivos específicos para controle de leveduras deve ser recomendado com cautela.

**TABELA 6:** CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS, LEVEDURAS E FUNGOS EM SILAGEM DE MILHO

Variáveis <sup>1</sup>	Tratamento <sup>2</sup>					EPM <sup>3</sup>
	Controle	Maize	Fire	Sil	Row	
BAL, log UFC g <sup>-1</sup>	5,35	6,11	5	5	5,85	0,33
Leveduras, log UFC g <sup>-1</sup>	4,89 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>	<10 <sup>-2b</sup>	4,7 <sup>a</sup>	4,17 <sup>b</sup>	0,08
Fungos, log UFC g <sup>-1</sup>	<10 <sup>-2</sup>	<10 <sup>-2</sup>	<10 <sup>-2</sup>	<10 <sup>-2</sup>	<10 <sup>-2</sup>	<10 <sup>-2</sup>

Médias com letras distintas na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup> BAL = Bactérias ácido lácticas; UFC unidades formadoras de colônias;

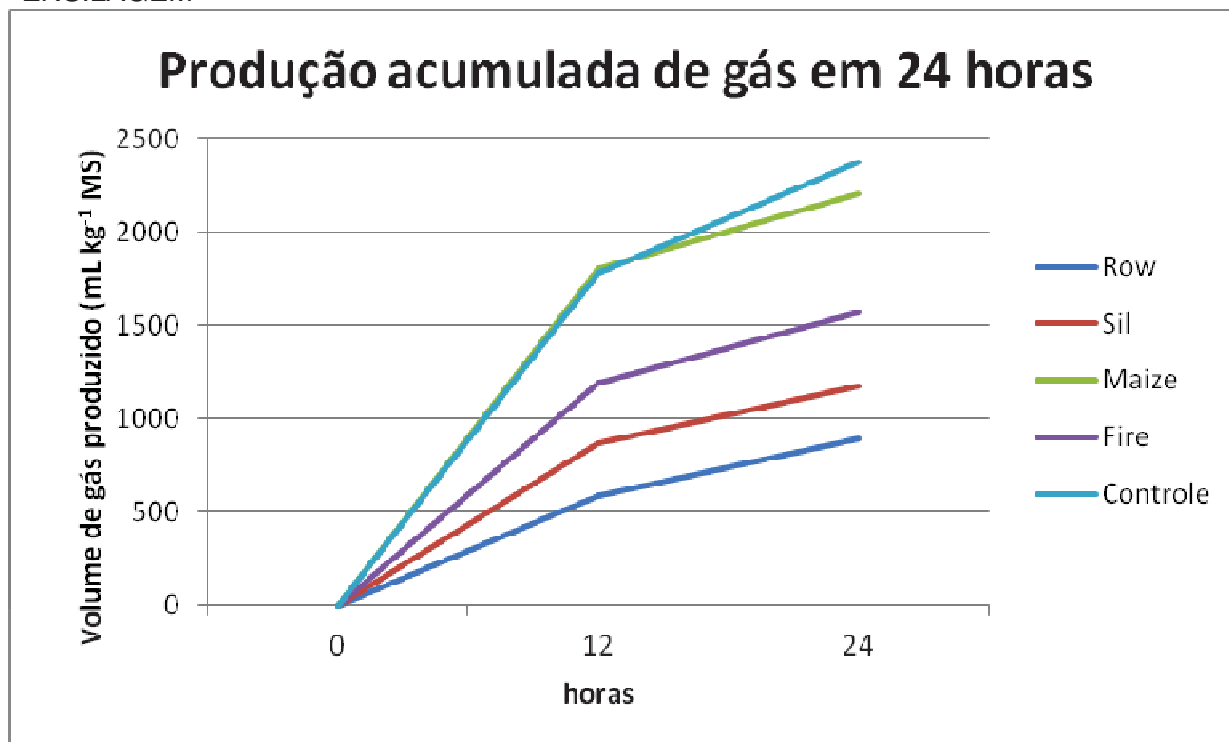
<sup>2</sup> **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2 x 10<sup>5</sup> ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas. **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (1 x 10<sup>5</sup> ufc/g de MV). **FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* (1 x 10<sup>5</sup> ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase e β glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2,5 x 10<sup>5</sup> ufc/g MV). **CONTROLE** sem aditivo. Limite de contagem para leveduras e fungos (> 10<sup>2</sup>).

<sup>3</sup> Erro padrão da média

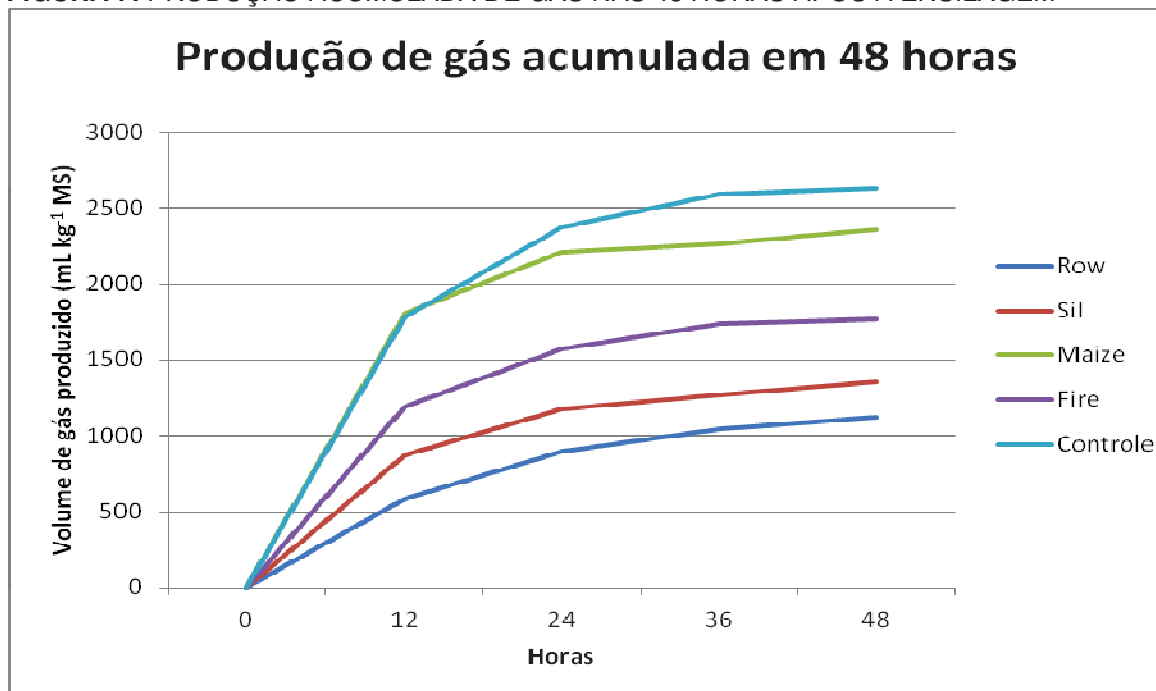
A menor contagem de leveduras no tratamento Fire pode ser explicada pela presença de benzoato de sódio neste aditivo. Efeito similar foi observado por Souza (2015), utilizando o mesmo aditivo em silagem de capim elefante.

Na Figura 6 está apresentada a dinâmica de produção de gases durante 24 horas após o fechamento dos silos. De maneira geral podemos observar um nítido efeito dos aditivos sobre o volume de gás produzido, sendo que os tratamentos Controle e Maize produziram quase 4 vezes mais gás nas primeiras 12 horas pós fechamento em relação ao Row. No entanto, se levarmos em conta a sequência da ensilagem (Row > Sil > Fire > Maize > Controle), notaremos que Controle e Maize foram os últimos tratamentos ensilados e que tiveram maiores volumes de produção de gás. A diferença de tempo (± 3 horas) entre a ensilagem do material pode ter causado influência na atividade de microrganismos e que foi percebida na avaliação dessa variável.

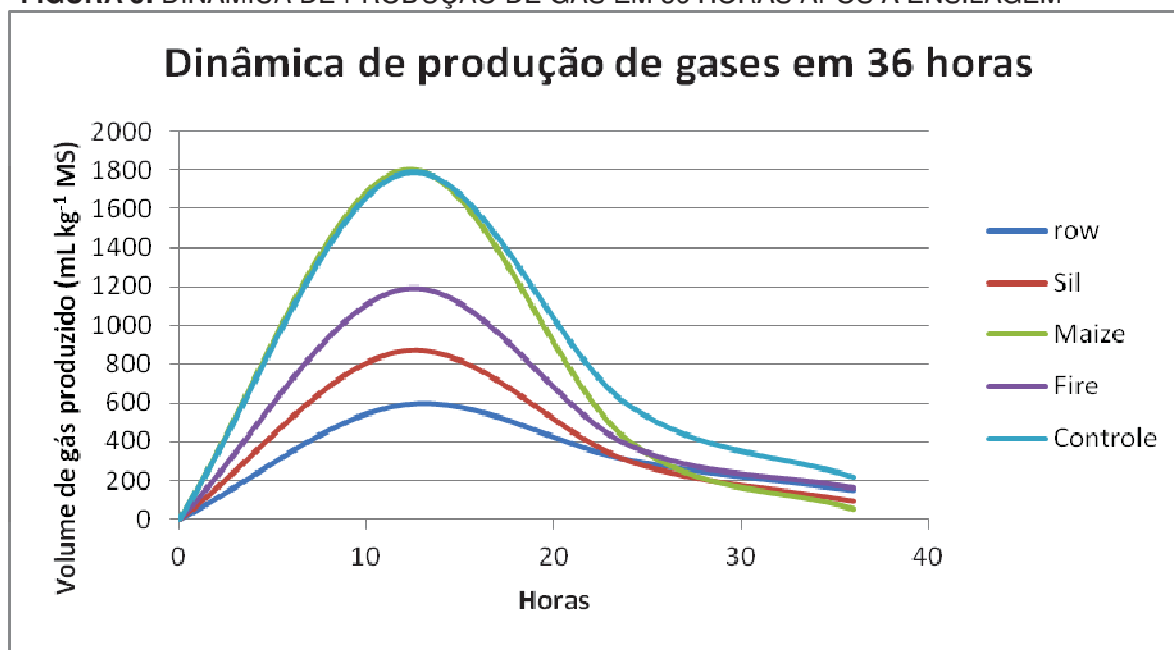
**FIGURA 6:** PRODUÇÃO DE GASES NAS PRIMEIRAS 24 HORAS APÓS A ENSILAGEM



Como demonstrado na Figura 7, a produção de gás persistiu por aproximadamente 48 horas após o fechamento dos silos, com os tratamentos Fire, Sil e Row apresentando os menores volumes acumulados. A diminuição na produção de gás após esse período indica uma redução no metabolismo de bactérias e início da estabilização da massa.

**FIGURA 7: PRODUÇÃO ACUMULADA DE GÁS NAS 48 HORAS APÓS A ENSILAGEM**

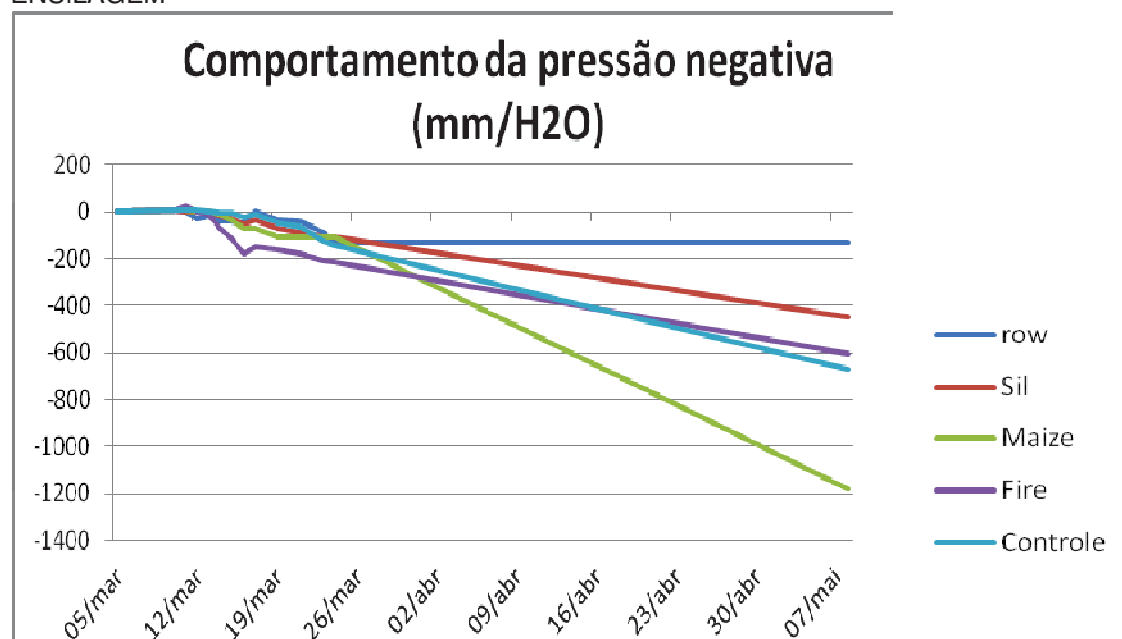
A velocidade de produção de gases permaneceu elevada até 24 horas após a ensilagem. O pico de produção de gás aconteceu  $\pm$  12 horas após a ensilagem para todos os tratamentos e o volume de produção foi menor ( $P < 0,05$ ) para o tratamento Row (589 mL kg MS) e maior para os tratamentos Maize e Controle (1803 mL kg MS e 1784 mL kg MS), respectivamente (Figura 8).

**FIGURA 8: DINÂMICA DE PRODUÇÃO DE GÁS EM 36 HORAS APÓS A ENSILAGEM**



Do quinto ao décimo terceiro dia a pressão dos silos permaneceu estável. Em seguida iniciou-se a fase de pressão negativa no interior dos silos a qual foi aumentada gradativamente até o dia da abertura, conforme demonstrado na Figura 9. A pressão variou de -100 até -1200 mm/H<sub>2</sub>O, que é equivalente a -0,98 e - 11,76 kPa.

**FIGURA 9:** PRESSÃO INTERNA DOS SILOS EXPRESSA EM mmCA APÓS 93 DIAS DE ENSILAGEM



É possível observar uma correlação inversa de pressão negativa com a produção de gases ( $r = -0,513$  e  $P = 0,014$ ). Na Figura 7 é possível ver que os tratamentos com maiores produções foram: Maize, Controle, Fire, Sil e Row e que a pressão negativa acompanhou a mesma tendência.

Vale ressaltar que o limite máximo de medição do manômetro construído era de -1200 mm à +1200 mm. Pelo que foi observado, a força do vácuo nos silos do tratamento Maize era maior que a capacidade de aferição do aparelho construído. Assim, após essa abordagem e verificação inicial, decidimos usar manômetro com maior amplitude de faixa de avaliação nos ensaios seguintes.

#### **4.4 CONCLUSÃO**

Nas condições desse ensaio os aditivos utilizados apresentaram pequeno efeito sobre variáveis de composição química, compostos voláteis, estabilidade aeróbia e população de leveduras. A sequência de montagem dos tratamentos na ensilagem demonstrou ser uma importante fonte de variação na composição química e produção de gases na ensilagem de milho. A fase de pressão negativa no interior dos silos foi comprovada com a utilização de manômetro de coluna de água, e esse efeito precisa ser melhor estudado.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A. T., and KIM, S. C. Factors affecting the quality of corn silage grown in hot, humid areas 1: Effect of delayed sealing, simulated rainfall and ensiling temperature. **Journal of Animal Science**. v. 83. p. 383-387. 2005.
- BASSO, F. C., BERNARDES, T. F.; ROTH, A. P. T. P.; LODO, B. N.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 41. n° 7, p. 1789-1794. 2012.
- DANIEL, J. L. P.; WEIß, K., CUSTÓDIO, L., SÁ NETO, A., SANTOS, M. C., ZOPOLLATTO, M., NUSSIO, L. G. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 185, p. 101-105, 2013.
- DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, S. J. W. H., and SPOLSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**. n° 87, p. 583-594. 1999.
- FAIRBAIRN, R. L., ALLI, I., PHILLIP, L. E. Proteolysis and amino acid degradation during ensilage of untreated or formic acid-treated lucerne and maize. **Grass and Forage Science**, n° 47, p.382–390. 1992.
- HAFNER, S. D., MONTES, F., ROTZ, C. A., MITLOEHNER, F. Ethanol emission from loose corn silage and exposed silage particles. **Atmospheric Environment**. v. 44, p. 4172-4180. 2010.
- HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p.1791–1794. 1999
- JOBIM, C. C., NUSSIO, L. G., REIS, R. A.; e SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n° 36, p.101-120. 2007.
- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., e REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 41, p.103-125. 1998.
- KLEINSCHMIT D. H., SCHMIDT, R. J., and KUNG, L. Jr, The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 2130–2139. 2005.
- KNICKÝ, M., SPÖRNDLY, R. Sodium benzoate, potassium sorbate and sodium nitrite as silage additives. **Journal Science Food Agriculture**. v. 89, p. 2659-2667. 2009.

KROONEMAN, J., FABER, F., ALDERKAMP, A. C., OUDE ELFERINK, S.J.H.W., DRIEHUIS, F., CLEENWERCK, I., SWINGS, J., GOTTSCHAL, J. C., and VANCANNEYT, M. *Lactobacillus diolivorans* sp. Nov., a 1,2 propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 52, p. 639-646. 2002.

KUNG Jr., L., STOKES, M. R., LIN, C. J. Silage additives. In: Silage Science and Technology. Agronomy Monograph 42 (Eds Buxton D. R., Muck R. E., Harrison J. H.), **American Society of Agronomy, Crop Science Society of America**, Soil Science Society of America, Madison, p. 305–360. 2003.

KUNG, Jr. L., and SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage. Wisconsin Team Forage. v. 3, n° 13, p. 1-5. 2001.

KUNG Jr., L., TUNG, R. S., MACIOROWSKI, K., BUFFUM, K., KNUTSEN, K., and AIMUTIS, W. R. Cell wall degrading enzymes and lactic acid bacteria as silage additives. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 4284-4296. 1991.

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publications. 1991.

MUCK, R. E., and KUNG, Jr. L., Effects of silage additives ensiling. In Proc. Silage: **Field to Feedbunk. NRAES-99. Natural Resource, Agriculture, and Engineering Service**, Ithaca, NY. p. 187-199. 1997.

NOVINSKI, C. O., SILVA, E. P. A., RESTELATTO, R., PEREIRA, L. M., ZOPOLLATTO, M., SCHMIDT, P. Anaerobic respiration by epiphytic microbial in corn silage. In: **53ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Gramado, RS. Anais... Gramado: SBZ, 2016.

OLIVEIRA, A. S., Z. G. WEINBERG, I. M. OGUNADE, A. A. P. CERVANTES, K. G. ARRIOLA, Y. JIANG, D. KIM, X. LI, M. C. M. GONÇALVES, D. VYAS, AND A. T. ADESOGAN. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.100. p. 4587–4603. 2017

OUDE ELFERINK, S. J. W. H., KROONEMAN, J., GOTTSCHAL, J. C., SPOELSTRA, S. F., FABER, F., and DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 67, p. 125-132. 2001.

PAHLOW, G., MUCK, R. E., DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, S. J. W. H., and SPOELSTRA, S. F. Microbiology of ensiling. In Silage Science and Technology. D.R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, ed. **American Society of Agronomy**. Madison, WI. p. 31-93, 2003.

SANCHEZ, R. F., CAMERON, D. C., and COONEY, C. L. Influence of environmental factors in the production of (R)-1,2 propanediol and acetol by *Clostridium thermosaccharolyticum*. **Biotechnology Letters**. v. 9, p. 449-454. 1987.

SANTOS, A. O., ÁVILA, C. L. S., PINTO, J. C., CARVALHO, B. F., DIAS, D. R., and SCHWAN, R. F. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silage inoculated with new tropical lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 120, p. 266-279. 2015.

SCHMIDT, P., NOVINSKI, C. O., CARNEIRO, E. W. and BAYER, C. Greenhouse gas emissions from fermentation of corn silage, In: Kuoppala, K., Rinne, M., & Vanhat-allo, A. (eds). **Proceedings of the XVI International Silage Conference, Hämeenlinna, Finland**, 2012, p. 448-449. 2012

SILVA, D. J., A. C. QUEIROZ. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002, 235p.

SILVA, N. C., SANTOS, J. P., ÁVILA, C. L. S., EVANGELISTA, A. R., CASAGRANDE, D. R., BERNARDES, T. F. Evaluation of the effects of two *Lactobacillus buchneri* strains and sodium benzoate on the characteristics of corn silage in a hot-climate environment. **Grassland Science**, v. 60, p. 169-177. 2014.

SKONIESKI, F. R., VIÉGAS, J.; MARTIN, T. N.; NÖRNBERG, J. L.; MEINERZ, G. R.; TONIN, T. J.; BERNHARD, P.; FRATA, M. T. Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 46. n° 9, p. 722-730. 2017.

SOUZA, C. M. Impacto ambiental da produção de silagens: Revisão da literatura e avaliação experimental em silos laboratoriais. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 2015, 132f.

SPOELSTRA, S. F., COURTIN, M. G., and VAN BEERS, J. A. C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal Agriculture Science**, Cambridge. v. 111, p. 127-132. 1988.

SUCU, E., KALKAN, H., CANBOLAT, O., FILYA, I. Effects of ensiling density on nutritive value of maize and sorghum silages. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 45, n° 10, p. 593-603. 2017.

SUZUKI, T., and H. ONISHI. Aerobic dissimilation of  $\alpha$ -rhamnose and the production of  $\alpha$ -rhamnoic acid and 1,2 propanediol by yeast. *Agricultural and Biology Chemistry*. v. 32, p. 888-893. 1968.

URIARTE-ARCHUNDIA, M. E., BOLSEN, K. K., BRENT, B. E. A study of the chemical and microbial changes in whole-plant corn silage during fermentation and storage: effects of packing density and sealing technique. Kansas **Agricultural Experiment Station Research** Report., v. 1. nº 347, p.146-150. 2002.

WEINBERG, Z. G., SZAKACS, G., ASHBELL, G. and HEN, Y. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. **Journal Applied of Microbiology**. v. 90, p. 561–566. 2001.

WEISS, K., KROSCHEWSKI, B., and AUERBACH, H. Effects of air exposure, temperature and additives on fermentation characteristics, yeast count, aerobic stability and volatile organic compounds in corn silage. **Journal of Dairy Science**. V. 99, nº 10, p. 8053-8069. 2016.

WEISSBACH, F. The future of forage conservation. In: **II International Symposium on Forage Quality and Conservation**: 2., São Pedro, 2011. Proceeding... Piracicaba: FEALQ, 2011, p.319-363. 2011.

WOOLFORD, M.K. The detrimental effect of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 101-116. 1990

## 5 CAPITULO II- EFEITO DA TEMPERATURA AMBIENTE NA FERMENTAÇÃO DE SILAGENS DE MILHO INOCULADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS COMERCIAIS

### Resumo

As condições ambientais de ensilagem e de armazenamento causam grandes influência no metabolismo microbiano, no padrão fermentativo e na fase pós abertura do silo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da temperatura de armazenamento em silagens de milho, tratadas com aditivos microbianos, sobre a composição química, microbiologia, estabilidade aeróbia, produção de gases e pressão interna dos silos. As plantas foram ensiladas com  $266,4 \text{ g kg}^{-1}$  MS e mantidas em duas salas com temperatura controlada à  $27,1^\circ\text{C}$  e  $15,2^\circ\text{C}$ , caracterizando ambiente quente e frio, respectivamente. Os aditivos eram compostos por diferentes combinações e taxas de inoculação de bactérias ácido lácticas heteroláticas (BAL), enzimas fibrolíticas e benzoato de sódio. Os silos experimentais foram adaptados com sistema de coleta e mensuração dos gases produzidos durante o período fermentativo (93 dias). A pressão interna dos silos foi avaliada utilizando manômetro em coluna de mercúrio “U” e os resultados expressos em milímetros de água. Os aditivos apresentaram efeito sobre a fração FDN, FDA e produção de efluente das silagens. O ambiente quente reduziu o teor de proteína bruta ( $99,1 \times 108,4 \text{ g kg}^{-1}$  MS) e aumentou a produção de efluente ( $6,1 \times 4 \text{ L t}^{-1}$  MV) das silagens em comparação ao ambiente frio. A temperatura de armazenamento não afetou a população de BAL e leveduras, mas quando associada (ambiente frio) ao aditivo Fireguard reduziu o crescimento de leveduras e promoveu melhor estabilidade aeróbia ( $P < 0,05$ ). Silagens armazenadas em ambiente frio apresentaram fermentação homolática, enquanto que as silagens em temperatura maior tiveram um padrão fermentativo heterolático. Apesar desse resultado, as silagens armazenadas em temperatura baixa foram mais estáveis em aerobiose. A utilização de aditivo microbiano e a temperatura mais baixa reduziram a produção de gases durante a fase fermentativa. Após a fase de produção de gases, foi observada a formação de vácuo no interior dos silos e que se tornou mais forte com o passar do tempo. A temperatura ambiente não afetou a pressão interna dos silos que apresentou valor médio de  $-611 \text{ mmCA}$ . A temperatura de armazenagem e a utilização de aditivos foram responsáveis por importantes alterações na composição química, na atividade de microrganismos e estabilidade aeróbia de silagens de milho. Esse estudo apontou que pode ocorrer atividade de bactérias homoacetogênicas em silagens de milho, pela avaliação do vácuo no interior dos silos.

Palavras-chave: aditivos, benzoato de sódio,  $\text{CO}_2$ , enzimas, fixação, gases,

## Abstract

Conditions of ensiling and storage strongly affect the microbial metabolism, fermentative profile, and aerobic stability of silage. The aim of this study was to determine how the storage temperature can affect the chemical composition, microbiological population, aerobic stability, gases production, and internal silos pressure. The whole corn plants were ensiled with (266.4 g kg<sup>-1</sup> DM) and stored in a 27.1°C (hot) and 15.2°C (cool) controlled-temperature room for 93 days. The additives were composed of different bacterial as well as application rates of lactic acid bacteria (LAB), fibrolytic enzymes, and sodium benzoate. The experimental silos were equipped with the system that allowed collection and measurement of the total gases from the fermentative phase. The internal pressure was assessed by the tube-U manometer filled with mercury but the results were shown in mm of water. The additives impacted the NDF, ADF, and effluent production. Hot ambient decreased the crude protein content (99.1 x 108.4 g kg<sup>-1</sup> DM) and increased the effluent production (6.1 x 4 L t<sup>-1</sup> FM) when compared with silage from cool ambient. The LAB and yeasts population were not affected for the storage temperature, but when it was associated with the additive (fireguard), the combination reduced the yeast growth and increased aerobic stability ( $P < 0.05$ ). Silage storage in cool temperature, instead of hot, showed homolactic fermentation, whereas these silages were more stable than the other that had heterolactic fermentation. The cool temperature associated with microbial inoculation also reduced the gas production during storage phase. After the gas production phase ended, the internal silo pressure becomes negative and it was declining until the opening day. The average of the internal pressure assessment was -611 mmwC, and the temperature of storage did not affect the internal pressure. The storage temperature and the additive caused a significant impact on chemical composition, microbial activity, and aerobic stability of corn silage. This study suggested that can occurs homoacetogens bacterial action by the internal pressure measurement of the experimental silos.

Key-words: additives, CO<sub>2</sub>, enzymes, gases, sequestration, sodium benzoate



## 5.1 INTRODUÇÃO

Ensilagem é o método de conservação de forragem úmida pelo processo de fermentação natural, realizado por bactérias epifíticas presentes na planta. Em condições anaeróbicas esses organismos convertem carboidratos solúveis em ácidos orgânicos, preferencialmente o ácido lático.

Para que o processo de ensilagem seja considerado eficiente (alta recuperação de matéria seca e preservação dos nutrientes) fatores como umidade, temperatura e presença de oxigênio devem ser controlados. Dentre esses, a presença de ar no interior do silo é o agente com maior efeito deletério, pois permite a atividade de microrganismos aeróbios que causam deterioração da silagem (Weinberg et al., 2001). A presença de oxigênio prolonga a fase respiratória das células da planta e das bactérias aeróbias, gerando produção de calor (McDonald et al., 1991). A consequência dessa atividade pode ser facilmente percebida pelo aumento da temperatura, que pode alcançar valores acima de 40°C (Weise et al., 1977). Caso as silagens sejam produzidas e armazenadas em ambientes quentes, a alta temperatura da massa perdura em patamares elevados por longo período (Weinberg e Ashbell, 1994). Muitos estudos mostram que silagens estocadas em temperaturas elevadas apresentam menor concentração de ácido lático e pior estabilidade em aerobiose (Nishino e Uchida, 1998; Ashbell, 2002). Essa alteração ocorre devido a mudanças na população de microrganismos e consequentemente em seus produtos de fermentação.

Os microrganismos possuem uma importante característica de crescimento em diferentes temperaturas, podendo ser classificados em termófilos, mesófilos e psicrófilos. Os organismos termófilos encontram condições ótimas de crescimento quando as temperaturas estão acima de 45°C; já os mesófilos são os organismos que se desenvolvem em temperaturas entre 20 – 45°C; e os psicrófilos quando a temperatura ambiente está abaixo de 20°C (Stanier et al., 1969). Dessa maneira, a população de bactérias presente na silagem pode se adaptar conforme a variação da temperatura da massa e assim modificar a concentração dos compostos voláteis e ácido lático ao final do processo. Muck e Dickerson (1988) demonstraram que o aumento da temperatura de estocagem de 15 para 35°C favoreceu a proteólise e a maior

concentração de amônia em silagens de alfafa. Esse resultado indica que em temperaturas elevadas ocorre diminuição na atividade de bactérias do ácido láctico (BAL) e aumento de clostrídios, resultando em maiores perdas (McDonald et al., 1966), principalmente gasosas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a composição química, composição de voláteis, estabilidade aeróbia e microbiologia de silagens de milho tratadas com bactérias heterofermentativas facultativas armazenadas sob duas temperaturas-ambiente. Também, comparar a produção de gases e pressão interna dos silos em função das temperaturas distintas.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Centro de Pesquisas em Forragicultura (CPFOR) na Fazenda Experimental Canguiri – Universidade Federal do Paraná em Pinhais/PR. A ensilagem do material ocorreu em 04/04/2016, quando as plantas apresentavam 266,4 g kg<sup>-1</sup> MS. O híbrido utilizado foi o 2B633PW da empresa Dow AgroSciences.

A forragem foi picada utilizando picadora estacionária regulada para processamento teórico de partículas de 10 mm.

Como tratamentos foram utilizadas combinações de diferentes bactérias (Lallemand Animal Nutrition), compondo quatro aditivos: FIREGUARD: *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* com quantidade final inoculada de 1 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV de forragem e enzimas amilase, xilanase, β glucanase e benzoato de sódio. Sil-All: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* com quantidade final inoculada de 1 x 10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> de MV de forragem ensilada. MAIZE-ALL: composto pelos seguintes microrganismos: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* com quantidade final inoculada de 2,5 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV de forragem. ROW: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* com quantidade final inoculada de 2 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV de forragem e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas. E o tratamento CONTROLE, sem aditivo. Todos os inoculantes foram diluídos em

100 ml de água destilada e aplicados utilizando borrifador manual. No tratamento controle foram aplicados somente 100 ml de água destilada.

### 5.2.1 Ensilagem e armazenamento

As plantas foram colhidas manualmente e transportadas inteiras até o laboratório. Somente a quantidade certa para cada tratamento era picada enquanto que as demais plantas permaneciam inteiras e abrigadas do sol. Após a aplicação dos tratamentos e coleta de amostras, porções iguais (5 kg de matéria verde) e individuais eram pesadas para compor as repetições de cada tratamento. Esse procedimento foi adotado para manter a mesma massa específica em todos os silos, estabelecida em  $600 \text{ kg MV m}^3$ . A compactação do material foi realizada com auxílio de bastão de madeira. A extremidade que tinha contato com a silagem foi devidamente protegida com plástico que era substituído a cada mudança de tratamento.

A ordem de ensilagem seguida foi: 1º. FIREGUARD, 2º. SIL-ALL, 3º. MAIZE, 4º. ROW, 5º. CONTROLE. Para cada tratamento foram preparadas 8 repetições. Quatro repetições de cada tratamento foram mantidas em sala com temperatura controlada a  $27,1 \pm 1^\circ\text{C}$  (ambiente QUENTE) e a outra metade mantida em sala com temperatura controlada a  $15,2 \pm 5^\circ\text{C}$  (ambiente FRIO) por 95 dias. Dentro de dois silos de cada tratamento foram inseridos dataloggers programados para registro da temperatura da silagem a cada 30 minutos.

### 5.2.2 Sistema de coleta de gases e medição de pressão

Como silos experimentais foram utilizados tubos de PVC com 150 mm de diâmetro e 50 cm de altura com volume útil total de 8,48 L. Os silos foram equipados com aparato para mensuração de gases produzidos durante a fase fermentativa segundo metodologia descrita por Souza (2015). Os registros do volume de gás foram realizados durante 113 horas consecutivas até a produção cessar. Os intervalos de leituras foram determinados conforme a velocidade de produção, uma vez que o sistema desenvolvido apresenta limitação na

capacidade de armazenamento (1 litro), o que torna necessário o esvaziamento frequente para que não haja vazamento e perda dos gases. A utilização de silos hermeticamente fechados, além de permitir a coleta total dos gases, possibilita determinar a pressão no interior do recipiente. Para isso utilizamos um manômetro em coluna de mercúrio “U” (Salcas, modelo MCU) com escala de 3000 - 0 - -3000 mmCA, utilizado para medir a pressão dentro dos silos. Esse modelo de equipamento é capaz de determinar baixas pressões, tanto positivas quanto negativas. No presente ensaio foi determinada somente a pressão negativa.

Na extremidade do tubo foi acoplada uma válvula para permitir a ligação do manômetro com o sistema dos silos experimentais sem risco de vazamentos ou entrada de ar atmosférico. As leituras foram realizadas a cada três dias após o término da fase de fermentação (10 dias pós-ensilagem) e permaneceram com o mesmo intervalo até a abertura, com 95 dias.

### 5.2.3 Abertura dos silos e determinação de perdas fermentativas

Anteriormente à abertura os silos foram pesados para determinação das perdas fermentativas, como descrito por Jobim et al. (2007). A desensilagem foi realizada manualmente e o material retirado depositado em sacos plásticos (individuais e identificados) para homogeneização e coleta de amostras para as análises.

As amostras de silagem de todos os silos foram coletadas pelo mesmo avaliador e realizadas em duplicata. Após a homogeneização manual o responsável realizava a coleta de 5 subamostras para compor a porção final, que foi destinada para as análises químicas e físicas.

Os cálculos de perdas de MS durante o armazenamento foram realizados segundo Jobim et al.(2007).

### 5.2.4 Coleta e processamento das amostras

As análises da composição química das amostras foram realizadas pelos seguintes métodos: Proteína Bruta, pelo método de DUMAS; Matéria Mineral

(MM) e Matéria Seca (MS), pelo método descrito por Silva e Queiroz (2002); Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Fibra em Detergente Ácido (FDA), pelo método sequencial ANKOM, descrito por Holden (1999).

Para determinação do conteúdo de MS, duas porções de  $\pm 300$  g de amostra úmida foram coletadas de cada repetição até atingirem peso constante em estufa de circulação forçada a 65°C, revolvidas duas vezes ao dia. Outras duas amostras de silagem úmida de  $\pm 50$  g foram coletadas para avaliação de pH, microbiologia e concentração de compostos voláteis (COV). Para avaliação de pH, 25 g de amostra foi agitada por 1 minuto em água destilada e a leitura realizada na sequência com pHmetro digital (PG 1400, Gehaka). Após a leitura, a mistura (amostra+água) foi processada em liquidificador por 1 minuto em velocidade máxima. Ao término, o suco foi filtrado em gaze dupla e depois em filtro de papel Wattman 54. Após a última filtragem, uma fração de 2 mL foi coletada e armazenada em tubos Eppendroff e imediatamente congelada. As análises de ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, conforme metodologia descrita por Daniel et al. (2013).

#### 5.2.5 Plaqueamento e contagem microbiológica

O plaqueamento para determinação de bactérias ácido lácticas, leveduras e fungos foi realizado no mesmo dia da abertura do experimento no laboratório do CPFOR. Em 225 mL de solução Ringer, autoclavada no dia anterior, uma porção de 25 g de amostra foi homogeneizada por 4 minutos em agitador de pás tipo Stomacher (MA440/CF, Marconi) à velocidade de 150 RPM. Ao término da agitação a solução foi filtrada em gaze com três camadas. A partir do filtrado foram realizadas diluições sequenciais em caldo MRS (MRS Broth ACC – Rogosa e Sharpe, Merck) para crescimento de BAL, e solução Ringer para contagem de leveduras e fungos. As diluições ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) em caldo MRS foram plaqueadas em placas Petrifilm (AC, 3M<sup>®</sup>) e alocadas em jarra de cultivo de microrganismos contendo disco gerador de anaerobiose (anaerobac, Probac). A jarra foi mantida em estufa a 30°C e a contagem da população foi

realizada  $48h \pm 4$  após a incubação. As diluições ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) em solução Ringer foram plaquedas em placas Petrifilm (YM, 3M<sup>®</sup>) e incubadas em estufa de cultura com temperatura média de  $23,5^{\circ}\text{C}$  por 72h, para contagem sequencial de leveduras, e 120h, para contagem de fungos.

#### 5.2.6 Estabilidade aeróbica pós-abertura

Após todas as amostras coletadas, as silagens remanescentes nos sacos plásticos (identificados) foram submetidas à avaliação de estabilidade em anaerobiose por 240 horas. Uma porção de 3 kg de silagem de cada repetição foi acondicionada, sem compactação, em baldes plásticos individuais e mantidos em sala com temperatura controlada ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Um termômetro eletrônico registrador (datalogger EL-USB, Lascar), programado para registro automático da temperatura a cada 30 minutos, foi inserido no centro da massa em cada balde e outro foi mantido no interior da sala. Ao final do período de avaliação os baldes foram pesados e todo o material colocado em sacos plásticos individuais para homogeneização. A amostragem em 5 pontos diferentes foi usada para compor a amostra final usada para determinação do teor de MS e cálculo de perdas totais durante a estabilidade, sendo essa realizada em duplicata. A elevação da temperatura em  $2^{\circ}\text{C}$  em relação ao ambiente foi utilizada para determinar o intervalo de tempo em que houve a degradação da silagem. Outras variáveis calculadas para determinar o tempo de preservação da silagem pós-abertura foram: temperatura acumulada (Tacum = definida como a soma das temperaturas da silagem menos a temperatura ambiente), temperatura máxima registrada (Tmax) e horas para atingir a temperatura máxima (HTmax).

#### 5.2.7 Delineamento e Análise estatística

O delineamento experimental foi um esquema fatorial com 5 tratamentos (aditivos), 2 fatores (ambiente quente e frio) e 4 repetições, totalizando 40 unidades experimentais.

Os dados brutos foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variância foi avaliada e corrigida, quando necessário, pelo método Box-Cox.

As variáveis que apresentaram diferença significativa com probabilidade de erro menor que 5% na análise de variância (ANOVA) foram submetidas ao teste de comparação de médias (Tukey a 5% de significância). As médias relacionadas ao efeito de temperaturas foram comparadas utilizando o teste *t* de Student (5% de significância).

O software JMP® pro 13 foi utilizado para realização da análise estatística.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química da forragem de milho no momento da ensilagem está apresentada na Tabela 7. Foi observado aumento no teor de MS em função da ordem de ensilagem. O teor de MS esteve um pouco abaixo dos valores recomendados para ensilagem da planta de milho (entre 300 e 350 g kg<sup>-1</sup>); conseqüentemente, a forragem apresentou elevados teores na fração fibrosa (FDN e FDA). Os altos teores de FDN e FDA não condizem com a idade das plantas, uma vez que o teor de MS média estava em 265 g Kg<sup>-1</sup>. Alves et al. (2011), ensilando milho com 270 g Kg<sup>-1</sup> relataram valores de 477 e 277 g Kg<sup>-1</sup> MS para FDN e FDA, respectivamente. Os resultados encontrados nesse experimento podem estar relacionados com a baixa proporção de amido na planta, variável não analisada. Com o avanço da maturidade da planta ocorre maior acúmulo de amido (enchimento do grão) e decréscimo no teor de FDN (Jensen et al., 2005). Portanto, proporcionalmente, quanto mais nova a planta, menor é a presença de amido e conseqüentemente maior a fração fibrosa.



**TABELA 7: COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DO MILHO ANTES DA ENSILAGEM**

Variáveis <sup>2</sup>	Tratamentos <sup>1</sup>						DP <sup>3</sup>
	Controle	Row	Sil	Maize	Fire	Média	
Matéria Seca, g Kg <sup>-1</sup>	273,8	272,3	260	268,8	254,6	265,9	0,83
MM, g Kg <sup>-1</sup> MS	51,7	45,0	48,1	47,4	38,1	46,1	0,21
Proteína bruta, g Kg <sup>-1</sup> MS	113,7	96,2	109,8	109,0	90,4	103,8	0,91
FDN, g Kg <sup>-1</sup> MS	661,9	734,3	684,9	701,3	640,1	684,4	3,59
FDA, g Kg <sup>-1</sup> MS	332,5	333,4	324,8	321,8	323,4	327,1	0,53
pH	5,78	5,76	5,74	5,69	5,62	5,72	0,06

Médias com letras distintas na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup> **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas. **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $1 \times 10^6$  ufc g<sup>-1</sup> de MV). **FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase,  $\beta$  glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2,5 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup> MV). **CONTROLE** sem aditivo. Ordem de ensilagem.

<sup>2</sup>MS= Matéria seca; MM= matéria mineral; FDN= Fibra em detergente neutro; FDA= Fibra em detergente ácido

<sup>3</sup>DP – Desvio padrão

A composição bromatológica das silagens avaliadas está apresentada na Tabela 8. O conteúdo de MS apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos. Maiores teores de MS foram encontrados nas silagens Row, Controle e Maize, e valor intermediário na silagem Sil. As silagens tratadas com o aditivo Fire apresentaram o menor conteúdo de MS e consequentemente maior produção de efluente em relação às demais silagens. Dois fatores podem ter contribuído para esse efeito, maior umidade na ensilagem e a presença do benzoato de sódio neste aditivo. O uso de alguns aditivos durante a ensilagem pode causar rompimento das células da planta, levando ao extravasamento do conteúdo celular, estimulando a produção de efluente (Jaakkola et al., 2006), como pode ser o caso do benzoato. Pedroso et al. (2008), usando benzoato de sódio como aditivo na ensilagem de cana-de-açúcar, encontraram o mesmo efeito no aumento da produção de efluente de silagens tratadas. Apesar do teor de MS estar abaixo do valor mínimo de 300 g kg<sup>-1</sup> recomendado (McDonald et al., 1991), a produção de efluente foi baixa no presente ensaio.



**TABELA 8:** COMPOSIÇÃO BROMATOLOGICA DAS SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVO MICROBIANO

Variáveis <sup>2</sup>	Tratamento <sup>1</sup>					Efeitos <sup>3</sup>		
	Controle	Row	Sil	Maize	Fire	EPM	Temp	TempXT
MS, g Kg <sup>-1</sup> MS	271,8 <sup>a</sup>	272 <sup>a</sup>	264,1 <sup>b</sup>	270 <sup>a</sup>	254,2 <sup>c</sup>	0,09	**	NS
MM, g Kg <sup>-1</sup> MS	46,4	45,1	42,5	45,3	38,1	0,26	NS	NS
PB, g Kg <sup>-1</sup> MS	106,5	104,2	102,6	103,2	102,1	0,15	**	NS
FDN, g Kg <sup>-1</sup> MS	590,4 <sup>ab</sup>	614,1 <sup>ab</sup>	629,7 <sup>a</sup>	577,4 <sup>b</sup>	606,4 <sup>ab</sup>	1,16	NS	NS
FDA, g Kg <sup>-1</sup> MS	326,7 <sup>ab</sup>	336,2 <sup>a</sup>	340,7 <sup>a</sup>	315,1 <sup>b</sup>	342,2 <sup>a</sup>	0,47	NS	NS
pH	3,77 <sup>a</sup>	3,75 <sup>ab</sup>	3,71 <sup>abc</sup>	3,65 <sup>bc</sup>	3,65 <sup>c</sup>	0,01	NS	NS
Perdas de MS, %	1,40 <sup>a</sup>	-0,25 <sup>b</sup>	-0,72 <sup>b</sup>	1,55 <sup>a</sup>	1,40 <sup>a</sup>	0,33	**	NS
Gases, % MS	1,10 <sup>a</sup>	-0,66 <sup>b</sup>	-1,18 <sup>c</sup>	1,18 <sup>a</sup>	0,42 <sup>ab</sup>	0,36	NS	NS
Efluente, L t <sup>-1</sup> MV	3,42 <sup>a</sup>	4,22 <sup>a</sup>	4,88 <sup>a</sup>	3,51 <sup>a</sup>	9,68 <sup>b</sup>	0,95	**	NS

Médias com letras distintas na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup>**FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* (1 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase, β glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2,5 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV). **Sil-All:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (1 x 10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> de MV). **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas; **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup> MS= Matéria seca; MM = matéria mineral; FDN = Fibra em detergente neutro; FDA = Fibra em detergente ácido;

<sup>3</sup> efeitos de interação. Temp = temperatura; T = tratamento (aditivos); NS = não significativo; \* (P < 0,05); \*\* (P < 0,01).

O conteúdo de PB das silagens não apresentou diferença entre os tratamentos, demonstrando que houve adequado padrão fermentativo. A rápida redução de pH é um fator importante para diminuir a atividade proteolítica das enzimas da planta e assim prevenir a degradação de aminoácidos (Charmley, 2001). Os teores de FDN e FDA apresentaram efeito entre tratamentos. Silagens tratadas com o aditivo Maize apresentaram as maiores reduções na fração FDN em comparação ao aditivo Sil. Da mesma forma, essa redução foi notada na variável FDA em relação aos aditivos Fire, Sil e Row, resultado inverso ao esperado para esse ensaio. Os aditivos Fire e Row apresentam em sua composição enzimas fibrolíticas e a expectativa era que houvesse redução nos teores de FDN das silagens tratadas com esses inoculantes, efeito não observado. Lynch et al. (2015) adicionaram celulasas e xilanases na ensilagem de milho e notaram declínio mais rápido de pH e maior quantidade de carboidratos solúveis em relação à silagem Controle, porém nenhum benefício foi encontrado no valor nutritivo dessas silagens. No presente ensaio, a atividade enzimática pode ter sido afetada pelo baixo pH encontrado nas silagens e/ou ainda pela temperatura de armazenamento, mesmo que em duas condições. Kung (2014) ressalta que a celulase é um conjunto de endo e exo-β

glucanase, celobiohidrolase e celobiase, e que para uma completa quebra da celulose em glicose é necessário sinergismo entre essas enzimas e a dependência de condições de pH e temperatura ideais, situação dificilmente encontrada no interior do silo. Garlock et al. (2009), avaliando pré-tratamento enzimático para otimizar a produção de combustível de segunda geração com palhada de milho, observaram disponibilidade de até 22,5% a mais de xilose quando o material foi tratado com xilanase, porém as condições do ambiente eram diferentes ao desse experimento (pH 4,8 e temperatura de 60°C). Assim, o uso de enzimas em silagens apresenta grande potencial de utilização, no entanto, enzimas mais estáveis nas condições encontradas nas silagens precisam ser avaliadas.

Apesar de haver efeito de tratamento entre o pH das silagens, podemos afirmar que os valores médios encontrados (3,71) são característicos de forragens bem preservadas (McDonald et al., 1991). As silagens tratadas com os aditivos Fire e Maize apresentaram maiores reduções no pH em relação ao Controle. Esta variável, a exemplo da MS, pode ter sofrido efeito da ordem de ensilagem. É possível perceber que houve um aumento do pH das silagens, em relação à sequência de confecção dos tratamentos experimentais: 3,65; 3,65; 3,71; 3,75; 3,77 (FIRE > MAIZE > SIL > ROW > CONTROLE), respectivamente. Uma explicação para esse efeito é a redução na quantidade de carboidratos solúveis entre as primeiras e as últimas plantas ensiladas, mesmo em um curto intervalo de tempo ( $\pm 3$  horas entre o primeiro e o último tratamento). A maior exposição da forragem pode ter contribuído para consumo dos açúcares pela própria planta, ocasionando menor disponibilidade de substrato para as bactérias.

As perdas de MS observadas em todos os tratamentos foram de baixa magnitude, no entanto com efeito significativo. Da mesma forma que no experimento anterior (capítulo I), foram encontradas perdas negativas, porém com valores menos acentuados.

Não houve interação entre temperatura de armazenamento e aditivos. As variáveis teor de MS, teor de PB, perdas de MS e produção de efluente apresentaram efeito significativo de temperatura de armazenamento (Tabela 9).

**TABELA 9:** DESDOBRAMENTO DO EFEITO DA TEMPERATURA AMBIENTE SOBRE A COMPOSIÇÃO BROMATOLOGICA DAS SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS

Variáveis	Temperatura <sup>1</sup>		EPM <sup>2</sup>
	quente	frio	
Matéria Seca, g Kg <sup>-1</sup>	268,3 <sup>a</sup>	264,7 <sup>b</sup>	0,06
Proteína bruta, g Kg <sup>-1</sup>	99,1 <sup>b</sup>	108,4 <sup>a</sup>	0,09
Perdas de MS, %	0,22 <sup>a</sup>	1,15 <sup>b</sup>	0,21
Gases, % MS	-0,39 <sup>a</sup>	0,74 <sup>b</sup>	0,23
Efluente, L t <sup>-1</sup> MV	6,1 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup>	0,6

Médias comparadas pelo teste t de Student (P < 0,05)

<sup>1</sup> Quente = temperatura ambiente quente 27,1°C; Frio = temperatura ambiente frio 15,2°C;

<sup>2</sup> Erro padrão da média

Silagens armazenadas em temperatura quente apresentaram maior conteúdo de MS e produção de efluente, e menor teor de PB e perdas totais de MS. A redução no teor de proteína nas silagens armazenadas em ambiente quente pode estar relacionada com maior produção de efluente neste tratamento, uma vez que boa parte dos componentes solúveis da planta é carregada para o efluente, entre eles compostos nitrogenados (Oude Elferink et al., 2000).

Muito embora a produção de efluente tenha sido menor nas silagens com temperatura fria, as perdas totais de MS foram maiores. Isso mostra que a produção de gases tem forte impacto nas perdas totais de MS.

A maior produção de gases nas silagens armazenadas em temperaturas mais baixas não está relacionada com altas populações microbianas, mas possivelmente com o metabolismo dessas bactérias.

A contagem de bactérias, leveduras e fungos filamentosos está apresentada na Tabela 10.

**TABELA 10:** CONTAGENS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS, LEVEDURAS E FUNGOS EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS

Variáveis <sup>2</sup>	Tratamento <sup>1</sup>					EPM <sup>3</sup>	Efeitos <sup>4</sup>	
	Controle	Row	Sil	Maize	Fire		Temp	TempXT
BAL, log UFC g <sup>-1</sup>	4,37	4,45	4,00	5,88	5,22	1,09	NS	NS
Lev. log UFC g <sup>-1</sup>	4,83 <sup>bc</sup>	5,33 <sup>a</sup>	4,77 <sup>bc</sup>	5,11 <sup>ab</sup>	4,47 <sup>c</sup>	0,11	NS	**
Fungos, log UFC g <sup>-1</sup>	2,75	3,48	2,10	2,78	2,76	0,56	**	NS

Médias com letras distintas na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup> **FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* (1 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase, β glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2,5 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV). **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (1 x 10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> de MV). **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas; **CONTROLE** sem aditivo.<sup>2</sup> BAL = bactérias ácido lácticas; Lev = leveduras;<sup>3</sup> Erro padrão da média

<sup>4</sup> Efeitos de interação. Temp = temperatura; T = tratamento (aditivos); NS = não significativo; \* (P < 0,05); \*\* (P < 0,01).

Houve efeito de tratamento sobre a população de leveduras e interação entre aditivos e temperaturas. O aditivo Fire apresentou menor contagem de levedura em relação aos tratamentos Maize e Row. Contagem semelhante foi observada para os tratamentos Sil, Controle e Fire. Dentre esses inoculantes o Fire é o único que tem em sua composição um composto químico (benzoato de sódio) com propriedades antimicóticas. O benzoato de sódio age diretamente sobre o crescimento de leveduras e fungos filamentosos. O modo de ação dessa substância ocorre pela liberação do respectivo ácido em meio úmido e assim inibe o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (Auerbach et al., 2012).

Ao contrário dos resultados encontrados no ensaio anterior (capítulo I), no qual o aditivo Fire foi mais eficiente para controlar o crescimento de leveduras, aqui a silagem tratada com o aditivo Fire não apresentou efeito na contagem de leveduras em relação à silagem Controle.

A contagem de fungos apresentou efeito de temperatura (dados não apresentados). Nesse caso a temperatura mostrou ser mais importante no desenvolvimento de fungos do que os aditivos usados. Nas silagens armazenadas em condições quentes a população foi maior ( $4,11 \log \text{ufc g}^{-1} \text{ MV}$ ) que em relação ao frio ( $1,43 \log \text{ufc g}^{-1} \text{ MV}$ ). O maior número de fungos encontrado nas silagens armazenadas em temperatura alta pode estar relacionado à adaptação dos organismos em climas mais quentes. Santos et al. (2015) relataram contagem de fungos próximas a  $4,3 \log \text{ufc g}^{-1} \text{ MV}$  em silagens de milho armazenadas por 30 dias, porém a população diminuiu para  $2 \log \text{ufc g}^{-1} \text{ MV}$  após 90 dias de ensilagem.

A população de leveduras foi afetada pela interação entre tratamento e temperatura de armazenamento (Tabela 11). No ambiente com temperatura mais alta os aditivos não influenciaram a população de leveduras. No entanto, quando a temperatura ambiente foi menor, o aditivo Fire apresentou os melhores resultados, reduzindo a população de leveduras quando comparadas com as demais silagens. Em condição de maior desafio (ambiente quente) o aditivo Fire não foi capaz de controlar o desenvolvimento desses organismos.

**TABELA 11:** DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS E TEMPERATURAS PARA CONTAGEM DE LEVEDURAS EM SILAGENS DE MILHO (LOG UFC g<sup>-1</sup> MV)

Tratamentos <sup>2</sup>	Temperatura <sup>1</sup>	
	Quente	Frio
Fire	5,12 <sup>b</sup>	3,81 <sup>aA</sup>
Maize	4,83	5,40 <sup>B</sup>
Sil	4,70	4,82 <sup>B</sup>
Row	5,28	5,40 <sup>B</sup>
Controle	4,91	4,73 <sup>B</sup>
Temperatura silo, °C	24,2	16,5

Médias com letras distintas minúsculas na linha e maiúsculas na coluna são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup> Quente = temperatura ambiente quente 27,1°C; Frio = temperatura ambiente frio 15,2°C

<sup>2</sup> **FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* (1 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase, β glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2,5 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV). **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (1 x 10<sup>6</sup> ufc g<sup>-1</sup> de MV). **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas; **CONTROLE** sem aditivo;

<sup>2</sup> Temperatura silo = Temperatura média aferida no interior do silo por 95 dias utilizando datalogger inserido da massa.

A diminuição na população de leveduras na silagem tratada com o aditivo Fire mantidas em ambiente frio, não estão relacionadas com a composição de ácido láctico e acético (Tabela 14), mas pode ser em função do benzoato de sódio.

Com base na análise desses resultados é possível afirmar que o efeito isolado da temperatura não foi determinante para controlar a atividade de leveduras. A mudança dessa população durante a fermentação de silagens de milho não tratadas em diferentes temperaturas foi estudada por Zhou et al. (2016). Esses autores mostraram que as leveduras ácido-tolerantes permaneceram ativas pelo período de ensilagem (60 dias) em baixas temperaturas (<15°C) e não foram encontradas (nível de detecção > 2 log ufc g<sup>-1</sup> MV) nas silagens armazenadas a 25°C pelo mesmo tempo. Assim, podemos afirmar que a associação do aditivo Fire com a temperatura baixa foi decisiva para melhor resposta do inoculante sobre a inibição do crescimento de leveduras.

As menores concentrações de ácido acético nas silagens aditivadas com Fire e Maize (Tabela 12) podem ter contribuído para o maior desenvolvimento de leveduras. Os inoculantes utilizados para tratar as silagens não alteraram as concentrações de ácido láctico, propiônico e butírico.

**TABELA 12:** CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS

Variáveis	Tratamento <sup>1</sup>					EPM	Efeitos <sup>2</sup>	
	Controle	Row	Sil	Maize	Fire		Temp	TempXT
Lático, g kg <sup>-1</sup> MS	56,1	56,0	55,0	51,1	48,7	0,22	*	*
Acético, g kg <sup>-1</sup> MS	19,7 <sup>a</sup>	15,4 <sup>ab</sup>	18,5 <sup>a</sup>	12,9 <sup>b</sup>	13,2 <sup>b</sup>	0,12	**	**
Propiônico, g kg <sup>-1</sup> MS	3,1	3,0	3,1	3,1	3,0	0,01	NS	NS
Butírico, g kg <sup>-1</sup> MS	2,9	2,8	2,9	2,8	2,8	0,01	NS	NS

Médias com letras distintas na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup>**FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase,  $\beta$  glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2,5 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup> MV). **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $1 \times 10^6$  ufc g<sup>-1</sup> de MV). **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas; **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup>Efeitos de interação. Temp = temperatura ambiente; T = tratamento (aditivos); NS = não significativo; \* (P < 0,05); \*\* (P < 0,01).

Em geral a concentração de ácido acético em silagens de milho é de 10 a 20 g Kg<sup>-1</sup> DM. Nível moderado desse ácido na silagem pode trazer benefícios na conservação do material, principalmente pela inibição de leveduras que resulta em melhor estabilidade aeróbia (Kleinschmit e Kung, 2006).

Os teores de ácido lático e ácido acético foram afetados pela temperatura e apresentaram interação com aditivo (P < 0,05; Tabelas 13 e 14).

**TABELA 13:** DESDOBRAMENTO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO E ACÉTICO EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS

Variáveis	Temperatura <sup>1</sup>		EPM <sup>2</sup>	Value P
	Quente	Frio		
Ácido lático, g Kg <sup>-1</sup> MS	51,1 <sup>b</sup>	55,8 <sup>a</sup>	0,14	0,03
Ácido acético, g Kg <sup>-1</sup> MS	19,5 <sup>a</sup>	12,4 <sup>b</sup>	0,08	<0,001

Médias com letras distintas, minúsculas, na linha são diferentes pelo teste t de Student (p<0,05)

<sup>1</sup> Quente = temperatura ambiente quente 27,1 °C; Frio = temperatura ambiente frio 15,2 °C;

<sup>2</sup> Erro padrão da média

As silagens armazenadas em temperatura quente apresentaram menor concentração de ácido lático e maior de ácido acético quando comparadas com as silagens em temperatura baixa. Apesar dessa diferença em relação ao ambiente, esse trabalho mostrou que a temperatura não restringiu a fermentação, pois adequados níveis de ácidos foram encontrados. Os valores típicos dos produtos finais de fermentação em silagem de milho para o ácido lático e acético estão entre 40-70 g Kg<sup>-1</sup> MS e 10-30 g Kg<sup>-1</sup> MS, respectivamente (Kung e Shaver, 2001). Zhou et al. (2016) notaram redução na concentração



desses ácidos em silagens armazenadas abaixo de 15°C por 60 dias. Por outro lado, silagens de milho armazenadas em ambiente quente (35°C) apresentaram redução na concentração de ácido láctico e aumento de ácido acético (Weiss et al., 2016), corroborando com os valores encontrados no presente trabalho.

A temperatura ambiente de armazenamento apresentou forte efeito sobre a produção dos ácidos láctico e acético (Tabela 14) nas silagens tratadas. Houve redução ( $P < 0,05$ ) na atividade homolática nas silagens em ambiente quente e aumento em ambiente frio. É possível notar que o ambiente quente favoreceu ( $P < 0,05$ ) a fermentação heterolática nas silagens tratadas com os aditivos (Row e Sil), não havendo influência da interação (temperatura X aditivo) nos demais tratamentos. Outro efeito claro foi observado nas silagens mantidas em ambiente frio, nas quais houve efeito significativo entre os inoculantes utilizados, tendo o tratamento Controle, no ambiente frio, apresentado maior concentração de ácido acético em relação aos tratamentos Row, Maize e Fire. O efeito claro de redução de ácido láctico e aumento de acético no ambiente quente para as silagens aditivadas demonstra que as bactérias presentes nos aditivos podem ter utilizado parte do lactato como fonte de substrato para crescimento, produzindo ácido acético (Oude Elferink et al., 2001). A mudança do metabolismo homolático para heterolático nas silagens armazenadas em temperatura maior indica que houve um rápido consumo dos carboidratos solúveis pelos microrganismos presentes na massa sem a queda do pH. Essa alteração metabólica das bactérias ácido lácticas é observada e estudada na indústria de processamento de leite (Kowalczyke Bardowski, 2007) e a dinâmica é similar com que ocorre na silagem. As hexoses são rapidamente degradadas para gliceraldeído-3-fosfato, seguidas de oxidação para piruvato pela via glicolítica. O piruvato é então reduzido para lactato pela enzima lactato desidrogenase, quando o crescimento dessas bactérias ocorre em meio rico em substrato. Por outro lado, quando há falta de substrato algumas BAL adaptam seu metabolismo para uma via alternativa ao da conversão do piruvato, tendo como produto final acetato, formato e etanol (McDonald et al., 1991). A menor taxa de metabolização de açúcar resulta em baixa concentração intracelular de frutose-1,6-bifosfato, que é um ativador essencial para a lactato desidrogenase (de Vries et al., 1970). Como demonstrado por Liu (2003) uma série de fatores pode afetar o metabolismo das BAL e causar a mudança do produto final

gerado. Zhou et al. (2016) destacaram que fatores ambientais como competição por substrato, umidade, pH e temperatura alteraram o padrão fermentativo das BAL em silagens de milho estocadas em diferentes amplitudes de temperaturas. Assim os resultados encontrados no presente ensaio suportam a hipótese que a temperatura ambiente (27,1°C) foi uma importante causa de variação para alteração do metabolismo homolático para heterolático das BAL inoculadas durante a fase de armazenamento.

As causas para a maior concentração de ácido láctico nas silagens em temperatura fria (Tabela 13 e 14) podem explicar dois acontecimentos. Primeiro, possivelmente houve melhor condições de desenvolvimento para as bactérias homoláticas em temperaturas mais baixas favorecendo a produção desse ácido e consequentemente rápido declínio de pH. Os resultados encontrados por (Weinberg et al., 1998) fundamentam essa suspeita, pois esses autores notaram que elevada temperatura de ensilagem e armazenamento reduziu a contagem de alguns tipos de BAL.

As silagens do tratamento Sil apresentaram maior amplitude de variação na produção de ácido láctico entre temperaturas. A maior taxa de inoculação nesse aditivo ( $1 \times 10^6$  ufc g<sup>-1</sup> MV) pode justificar a maior concentração de ácido láctico. Apesar da contagem de BAL no dia da abertura não mostrar diferença na interação temperatura x tratamento isso não significa menor crescimento dessas bactérias. Importante esclarecer que a contagem de microrganismos em silagens (abertura) não reflete a totalidade da população, apenas os microrganismos que permaneceram viáveis durante a fase fermentativa. Weinberg et al. (1998) avaliando a inoculação de *Lactobacillus plantarum* ( $10^6$  ufc g MV) em silagem de trigo observaram que a população diminuiu do dia 2 (log 9,8 ufc g<sup>-1</sup> MV) para o dia 57 (log 6,3 ufc g<sup>-1</sup> MV) mostrando que muitas bactérias morrem durante a fase de armazenamento.



**TABELA 14:** DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DE TRATAMENTO E TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO E ACÉTICO EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS (g kg<sup>-1</sup> MS)

Temperatura <sup>2</sup>	Tratamentos <sup>1</sup>				
	Controle	Row	Sil	Maize	Fire
Ácido lático					
Quente	56,0	58,0	45,7 <sup>B</sup>	48,5 <sup>B</sup>	46,8 <sup>B</sup>
Frio	56,3	54,0	64,4 <sup>A</sup>	53,7 <sup>A</sup>	50,6 <sup>A</sup>
Ácido acético					
Quente	18,9	20,9 <sup>A</sup>	23,3 <sup>A</sup>	17,0	17,6
Frio	20,5 <sup>ab</sup>	10,0 <sup>Bc</sup>	13,8 <sup>Bbc</sup>	9,1 <sup>c</sup>	8,8 <sup>c</sup>

Médias com letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup>**FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* (1 x 10<sup>5</sup> ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, β glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2,5 x 10<sup>5</sup> ufc/g MV). **Sil-All:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (1 x 10<sup>5</sup> ufc/g de MV). **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* (2 x 10<sup>5</sup> ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas; **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup>Quente = temperatura ambiente quente 27,1°C; Frio = temperatura ambiente frio 15,2°C;

Kim e Adesogan (2006) determinaram o efeito sobre as características fermentativas quando as silagens foram mantidas em temperaturas distintas (20 vs 40°C) por 82 dias. A principal mudança observada foi a redução da fermentação homolática quando o material ficou armazenado em ambiente com temperatura alta (40°C) quando comparado com a silagem mantida em temperatura menor (20°C). Apesar dos resultados desses autores (sobre a produção de ácido lático) corroborarem com os efeitos encontrados no presente estudo, o mesmo não aconteceu com a produção de ácido acético.

Contudo está claro, no presente ensaio, que a diferença de temperatura fez com que as bactérias direcionassem seu metabolismo para uma fermentação prioritariamente homolática em ambiente frio, e uma fermentação heterolática em ambiente quente. Embora tenha havido diferença na produção de ácidos orgânicos em função da temperatura, não foram observados efeitos de interação na maioria das variáveis avaliadas na estabilidade aeróbia. A estabilidade aeróbia e as perdas de MS durante a exposição ao ar apresentaram efeito (P < 0,01) de aditivo, temperatura e interação (temperatura x aditivo).

Os resultados da estabilidade aeróbia (EA) das silagens estão apresentados na Tabela 15. A variável (EA) foi influenciada pela presença dos aditivos. As silagens inoculadas com o aditivo Fire apresentaram melhor (P <

0,05) estabilidade em relação aos demais tratamentos. As silagens tratadas com o aditivo Row sofreram rápida degradação quando expostas ao ar, se comparadas com o aditivo contendo maior população inoculada (Sil) e o aditivo com benzoato de sódio (Fire). As variáveis temperatura máxima (Tmax), horas para temperatura máxima (HTmax) e temperatura acumulada na massa apresentam efeito de tratamento. O melhor resultado na variável Tmax para o tratamento Fire, em relação aos demais, demonstra o efeito isolado do composto químico no aditivo sobre a atividade dos microrganismos durante a exposição ao ar.

**TABELA 15:** VARIÁVEIS DE ESTABILIDADE EM AEROBIOSE DE SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVO MICROBIANO

Variáveis <sup>2</sup>	Tratamentos <sup>1</sup>					EPM	Efeitos <sup>3</sup>	
	Controle	Row	Sil	Maize	Fire		Temp	TempXT
EA, Horas	39,2 <sup>bc</sup>	30,2 <sup>c</sup>	43,2 <sup>b</sup>	36,1 <sup>bc</sup>	61,3 <sup>a</sup>	2,18	**	**
HTmax, horas	139 <sup>b</sup>	54,8 <sup>a</sup>	115 <sup>ab</sup>	66,6 <sup>ab</sup>	97,6 <sup>ab</sup>	18,5	NS	NS
Tmax, °C	37,6 <sup>b</sup>	37,6 <sup>b</sup>	36,1 <sup>b</sup>	37,8 <sup>b</sup>	33,7 <sup>a</sup>	0,48	NS	NS
TempAcum, °C	1426 <sup>ab</sup>	1718 <sup>b</sup>	737 <sup>ab</sup>	1192 <sup>ab</sup>	611 <sup>a</sup>	249	NS	NS
Perdas MS, %	18,1 <sup>b</sup>	16,1 <sup>ab</sup>	12,8 <sup>a</sup>	16,5 <sup>b</sup>	12,7 <sup>a</sup>	0,81	**	**

Médias com letras distintas na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup>**FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase,  $\beta$  glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2,5 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup> MV). **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $1 \times 10^6$  ufc g<sup>-1</sup> de MV). **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^5$  ufc g<sup>-1</sup> MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas; **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup> EA = Estabilidade aeróbia das silagens (horas para elevação da temperatura de massa em 2 °C acima da temperatura ambiente); HTmax = Horas para a massa atingir a máxima temperatura; Tmaa = temperatura máxima alcançada pela massa; TempAcum = Temperatura acumulada (soma dos graus até o final do ensaio de EA); Perdas EA = Perdas de MS durante o ensaio de estabilidade aeróbia;

<sup>3</sup>Efeitos de interação. Temp = temperatura ambiente; T = tratamento (aditivos); NS = não significativo; \* (p<0,05); \*\* (p<0,01).

A menor estabilidade aeróbia no tratamento Row, comparado com Fire e Sil, pode estar relacionada com as maiores populações de leveduras naquela silagem. Após a abertura dos silos a maior população iniciou um rápido metabolismo que fez com que a massa aquecesse rapidamente e acúmulo de maior temperatura. Além disso, a estabilidade de apenas 30,2 horas encontrada na silagem Row não pode ser explicada com as variáveis analisadas neste experimento. Avaliações complementares de outros compostos voláteis, além dos investigados nesse ensaio, poderiam dar suporte para o esclarecimento desse achado. Na literatura existe a suspeita que a adição de enzimas fibrolíticas (presentes nesse inoculante) pode liberar grandes quantidades de

açúcares durante a fermentação e que após a abertura servem como substrato para crescimento de leveduras (Kung e Muck, 2015). Lynch et al. (2015) adicionaram xilanases e celulasas associadas ou não com bactérias produtoras de esterase de ácido ferrúlico e mostraram que o uso combinado desses aditivos promoveu maior queda no pH e elevada concentração de carboidratos solúveis na silagem após 70 dias de fermentação. No entanto, essas mesmas silagens apresentaram menor recuperação de MS e alta população de leveduras ( $4,21 \text{ ufc g}^{-1} \text{ MV}$ ) comparadas com as silagens controle ( $2,75 \text{ ufc g}^{-1} \text{ MV}$ ). Dessa forma, uma possível associação dos fatores, alta contagem de leveduras, disponibilidade de substrato e padrão fermentativo homolático culminaram com o curto período de resistência em aerobiose.

As menores perdas de MS durante a estabilidade aeróbia no tratamento Fire podem estar relacionadas com a menor população de leveduras, como efeito do benzoato do sódio.

Não houve relação das perdas de MS na estabilidade em relação às perdas fermentativas. De maneira geral, essas perdas estão relacionadas com a qualidade da silagem, ou seja, quanto mais nutrientes forem preservados durante o processo de conservação, mais suscetíveis essas silagens serão à degradação em aerobiose. Isso ocorre em virtude da maior disponibilidade de carboidratos solúveis ou produtos de fermentação prontamente disponíveis para os agentes deterioradores. Zopollatto et al. (2009) verificaram que a estabilidade média para silagens de milho variou de 25 a 41 horas. Ao passo que Muck e Kung (1997), em compilação de trabalhos, mostraram que a inoculação com organismos homofermentativos na ensilagem de milho reduziu a estabilidade em 33% das silagens tratadas. Em recente meta-análise, Oliveira et al. (2017) apontaram que a estabilidade aeróbica não foi influenciada pelos aditivos nem pelas características da cultura. Porém, a população de leveduras foi maior nas silagens tratadas em relação às não tratadas, sendo que a razão para esse efeito é a maior disponibilidade de substrato para leveduras assimiladoras de lactato, segundo esses pesquisadores.

A Tabela 16 apresenta os resultados da interação ambiente x aditivos e efeito isolado do ambiente sobre a estabilidade das silagens. As silagens armazenadas em ambiente frio tiveram melhor desempenho quando expostas ao ar em relação às silagens estocadas em ambiente quente. Esse resultado

não corresponde com o tipo de fermentação encontrado nessas silagens. Se levarmos em consideração a fermentação heterolática percebida nas silagens em ambiente quente, deveríamos ter maior estabilidade nessas silagens em razão da maior concentração de ácido acético, em função da ação desse ácido sobre o crescimento de leveduras (McDonald et al., 1991).

Um fator importante que pode ter influência direta nesse resultado foi a temperatura inicial da massa da silagem, pois a silagem proveniente do ambiente frio apresentava 15,2°C, e o metabolismo microbiano pode ter sido mais lento, e beneficiado no resultado. Além disso, mesmo que a atividade tivesse início imediato, o calor gerado pode ter sido absorvido pela silagem aumentando o tempo para detectar o aquecimento. Outro efeito que pode ter contribuído para o melhor desempenho de estabilidade aeróbia das silagens derivadas do ambiente frio foi o comportamento dos tratamentos Fire, Sil e Controle, comparado com os respectivos tratamentos em ambiente quente. O resultado de EA do aditivo Fire no ambiente frio confirma os dados de contagem de levedura na mesma condição para esse tratamento.

**Tabela 16:** DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO ENTRE TRATAMENTO E TEMPERATURA E EFEITO DE TEMPERATURA PARA ESTABILIDADE AERÓBIA (HORAS) EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS

Temperatura <sup>2</sup>	Tratamentos <sup>1</sup>					Média	EPM
	Controle	Row	Sil	Maize	Fire		
Quente	24,7 <sup>B</sup>	23,1	32,1 <sup>B</sup>	29,5	34,2 <sup>B</sup>	28,7 <sup>B</sup>	3,6
Frio	53,8 <sup>Ab</sup>	37,0 <sup>c</sup>	54,3 <sup>Ab</sup>	42,5 <sup>bc</sup>	88,5 <sup>Aa</sup>	55,2 <sup>A</sup>	3,1

Médias com letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup>**FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase,  $\beta$  glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2,5 \times 10^5$  ufc/g MV). **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $1 \times 10^5$  ufc/g de MV). **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas; **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup>Temperatura de armazenamento; Quente = temperatura ambiente quente 27,1°C; Frio = temperatura ambiente frio 15,2°C;

O efeito de temperatura ambiente sobre a estabilidade aeróbia impactou nas perdas de MS (Tabela 17). As silagens que foram armazenadas em ambiente frio apresentaram menores perdas de MS ( $P < 0,01$ ) durante a estabilidade aeróbia (13,4%), comparadas com as silagens de ambiente quente (17,1%; Tabela 17). A menor perda de MS durante a estabilidade nas silagens estocadas em baixa temperatura pode ter sido causada pelas menores perdas

nos tratamentos Sil e Fire (9,1 e 10%, respectivamente) que acabaram reduzindo o valor médio de perdas nas silagens do ambiente frio. Convém destacar que o aditivo Sil contém a maior taxa de inoculação de bactérias entre todos os aditivos testados ( $1 \times 10^6$  ufc/g) e que apresentou a segunda maior concentração de ácido acético e o segundo melhor desempenho na estabilidade, muito embora sem efeito estatístico, mas somados, esses efeitos podem ter levado a menores perdas de MS durante a exposição aeróbia. Importante esclarecer que durante a estabilidade todas as silagens foram mantidas na mesma condição em sala com temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C.

**Tabela 17:** DESDOBRAMENTO DA INTERAÇÃO DE TRATAMENTO E TEMPERATURA PARA PERDAS DE MS (%) DURANTE A ESTABILIDADE AERÓBIA EM SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVOS MICROBIANOS

Temperatura <sup>2</sup>	Tratamentos <sup>1</sup>					Média	EPM
	Controle	Row	Sil	Maize	Fire		
Quente	20,3 <sup>b</sup>	15,8 <sup>a</sup>	16,6 <sup>Bb</sup>	17,2 <sup>b</sup>	15,4 <sup>a</sup>	17,1 <sup>B</sup>	0,51
Frio	15,8 <sup>b</sup>	16,2 <sup>b</sup>	9,1 <sup>Aa</sup>	15,9 <sup>b</sup>	10,0 <sup>a</sup>	13,4 <sup>A</sup>	0,51

Médias com letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup>**FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase,  $\beta$  glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2,5 \times 10^5$  ufc/g MV). **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $1 \times 10^6$  ufc/g de MV). **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas; **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup>Temperatura de armazenamento; Quente = temperatura ambiente quente 27,1°C; Frio = temperatura ambiente frio 15,2°C;

Os valores de perdas de MS na EA da silagem Sil podem ter contribuído para o efeito de temperatura nesta variável, uma vez que foram os menores e os únicos com significância estatística.

Em ambas as temperaturas as silagens com o aditivo Fire apresentaram as menores perdas de MS e efeito semelhante aconteceu para as silagens do tratamento Sil armazenadas em ambiente frio.

Com base nesses resultados podemos sugerir que a presença de composto químico benzoato de sódio no aditivo Fire pode ter contribuído para o melhor desempenho das silagens tratadas no ensaio de estabilidade aeróbia, confirmando os resultados encontrados por Souza (2015) utilizando o mesmo aditivo.

A dinâmica de produção de gases revelou novamente uma tendência de aumento de produção conforme a ordem de ensilagem. Os tratamentos Controle e Row apresentaram maior produção de gases ( $P < 0,01$ ). Isso pode

ser explicado pela diferença na intensidade de fermentação e na variação microbiana entre as silagens (Tabela 18).

**TABELA 18:** PRODUÇÃO TOTAL DE GASES (MENSURAÇÃO DIRETA) DURANTE A FASE FERMENTATIVA DE SILAGENS DE MILHO TRATADAS COM ADITIVO MICROBIANO

Variáveis <sup>2</sup>	Tratamentos <sup>1</sup>					EPM	Efeitos <sup>3</sup>	
	Controle	Row	Sil	Maize	Fire		Temp	Temp X T
Gás L Kg <sup>-1</sup> MS	3162 <sup>a</sup>	2957 <sup>a</sup>	2486 <sup>b</sup>	2567 <sup>b</sup>	2537 <sup>b</sup>	84,1	**	NS

Gás L Kg <sup>-1</sup> MS	Temperatura		EPM	Valor P
	Quente	Frio		
Gás L Kg <sup>-1</sup> MS	3092 <sup>b</sup>	2392 <sup>a</sup>	53,9	0,0001

Médias com letras distintas na linha são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância

<sup>1</sup>**FIRE:** *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase,  $\beta$  glucanase e benzoato de sódio. **MAIZE:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2,5 \times 10^5$  ufc/g MV). **Sil-Ail:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $1 \times 10^6$  ufc/g de MV). **ROW:** *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^5$  ufc/g MV) e enzimas amilase, xilanase, celulasas e hemicelulasas; **CONTROLE** sem aditivo.

<sup>2</sup>Produção total de gás em litros por kg de matéria seca ensilada

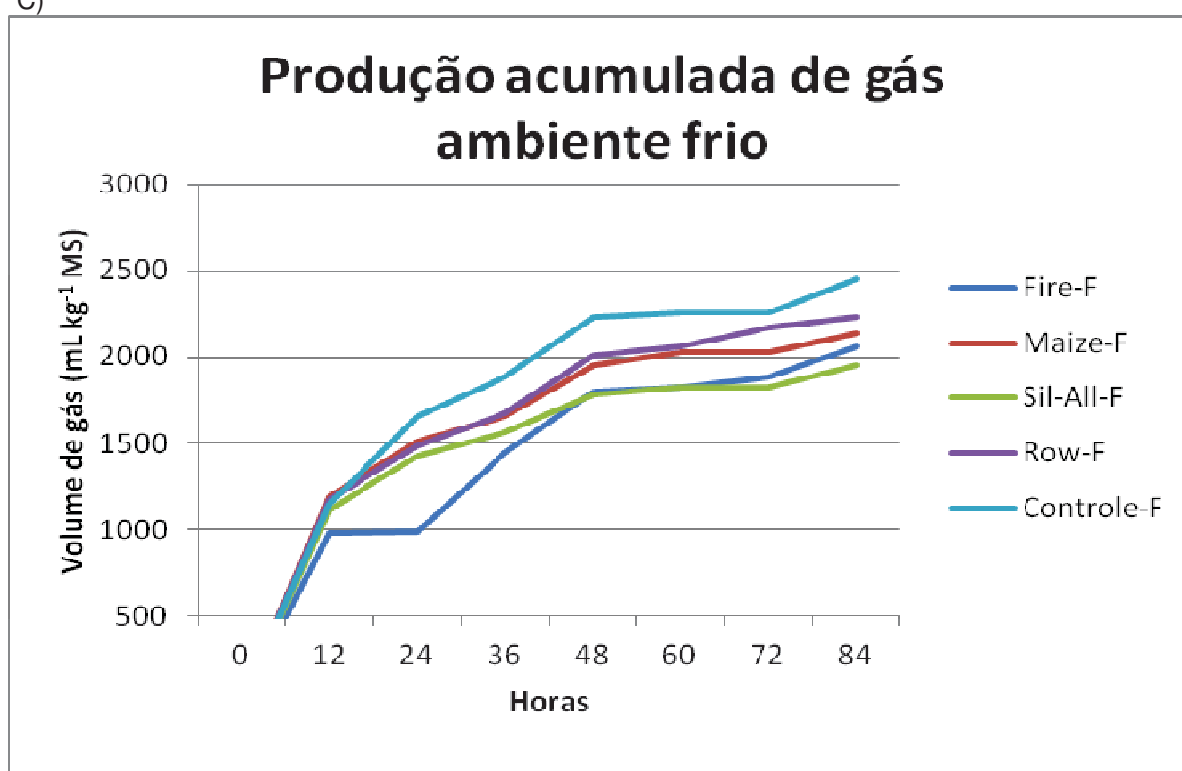
<sup>3</sup>Efeitos de interação. Temp = temperatura ambiente; T = tratamento (aditivos); NS = não significativo; \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ).

Não foi percebido aumento na produção de gases em função da inoculação das silagens. Por outro lado, o aditivo Fire apresentou menor produção de gases, bem como melhor controle de microrganismos indesejáveis.

As silagens armazenadas em temperatura quente produziram aproximadamente 700 mL de gás kg<sup>-1</sup> MS a mais do que as silagens em ambiente frio, no acumulado do período. Dois fatores podem ter contribuído para a diferença na produção de gases. Primeiro; em temperaturas mais baixas o metabolismo microbiano pode ter sido alterado. A mudança no padrão fermentativo nas diferentes temperaturas, conforme apresentado na Tabela 13, mostra que em temperatura baixa predominou a formação de ácido lático e que na temperatura mais alta a via preferencial foi a heterolática, com maior produção de ácido acético. Segundo; outro ponto que não pode ser ignorado é a lei dos volumes dos gases (lei de Charles) que diz que para um gás ideal o volume é diretamente proporcional à temperatura, dessa forma em ambiente frio o gás tende a ter menor volume e conseqüentemente menor produção. Convém afirmar que no presente ensaio, o volume mensurado de gases não foi corrigido para temperatura.

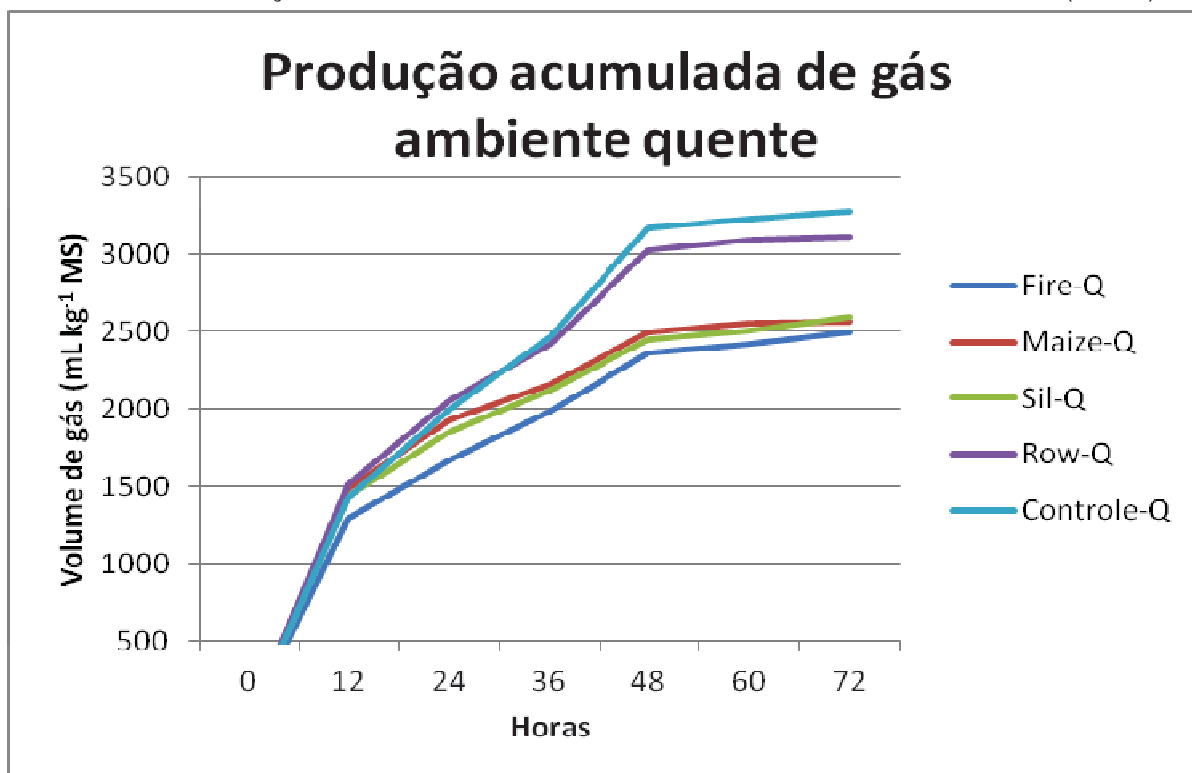
O volume acumulado de gases produzidos pelas silagens em ambiente frio está apresentado na Figura 10. É possível observar que em todo o período de avaliação o tratamento Controle produziu mais gás em relação às demais silagens. Para todos os tratamentos as primeiras 12 horas apresentaram a maior taxa de produção. Foi observada, no tratamento Fire, uma estabilização na produção de gás entre 12 e 24 horas após a ensilagem. Porém, ao final da fase de produção, o volume total de gases não apresentou diferença entre os tratamentos.

**FIGURA 10:** PRODUÇÃO ACUMULADA DE GÁS POR TRATAMENTO AMBIENTE FRIO (15,2 °C)



De maneira contrária, as silagens armazenadas em temperatura quente apresentaram forte influência da ordem de ensilagem no volume de gás produzido (Figura 11). Os dois últimos tratamentos ensilados foram Controle e Row que tiveram maiores ( $P < 0,01$ ) produções totais de gases (3,590 e 3,437 litros de gás), respectivamente, no período de avaliação em relação aos demais tratamentos. A fase de produção de gases foi mais curta nas silagens em ambiente quente (72 horas) quando comparada com as silagens em temperatura baixa (84 horas), mesmo assim o volume total foi maior.



**FIGURA 11:** PRODUÇÃO ACUMULADA DE GÁS POR TRATAMENTO AMBIENTE QUENTE (27,1 °C)

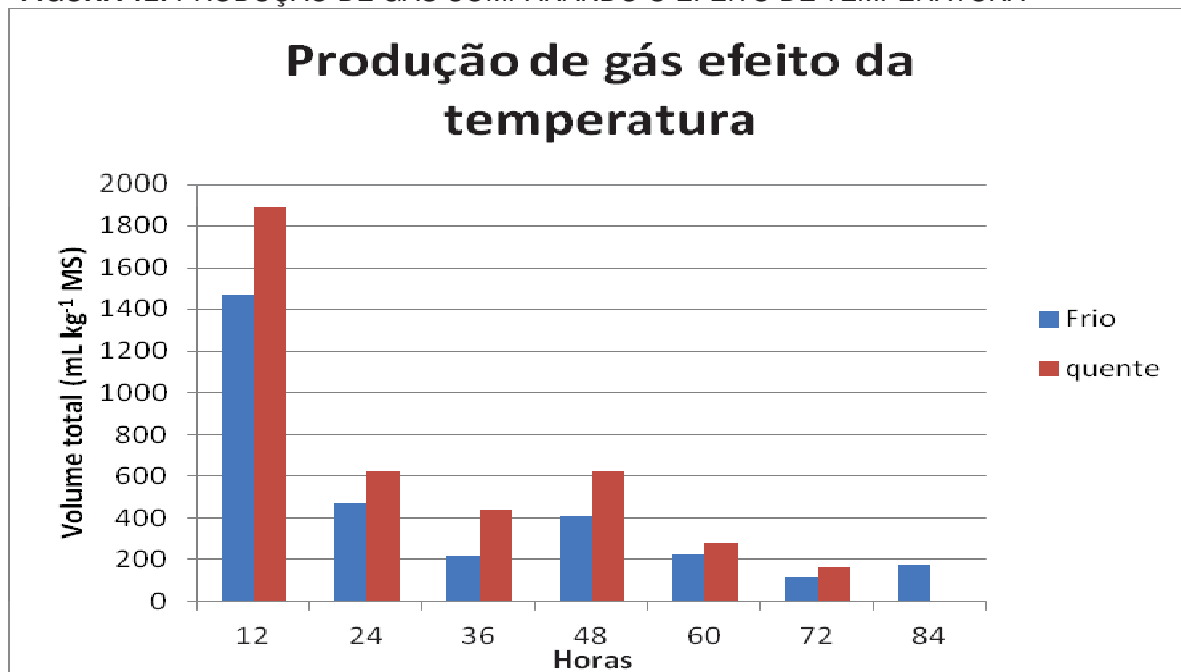
A dinâmica de produção foi semelhante para todas as silagens até 24 horas após o fechamento dos silos. Entre 24 e 72 horas o volume de produção de gás foi maior para as silagens Controle e Row e semelhante para as silagens Fire, Sil e Maize.

A figura 12 mostra a produção média de gás por tratamento nas diferentes temperaturas. É possível observar que as silagens em temperatura quente apresentaram maior produção de gases em relação às silagens em ambiente frio. As maiores produções aconteceram nas primeiras 12 horas e diminuíram até 36 horas quando um novo pico aconteceu para ambas às silagens em 48 horas, porém pouco pronunciado. A elevada produção de gases nas primeiras horas após a ensilagem corresponde ao período de maior intensidade de fermentação de acordo com Pahlow et al. (2003). De forma semelhante Knicky et al. (2014) durante a avaliação da formação de gases durante a ensilagem de milho, aditivadas ou não, verificaram o maior pico de produção entre 11-29 horas após a vedação. Descreveram ainda, um segundo pico de produção nas silagens aditivadas com inoculante microbiano ( $2,5 \cdot 10^5$  ufc g *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus buchneri*). Esse fenômeno foi atribuído ao metabolismo de *L. buchneri* que tem a



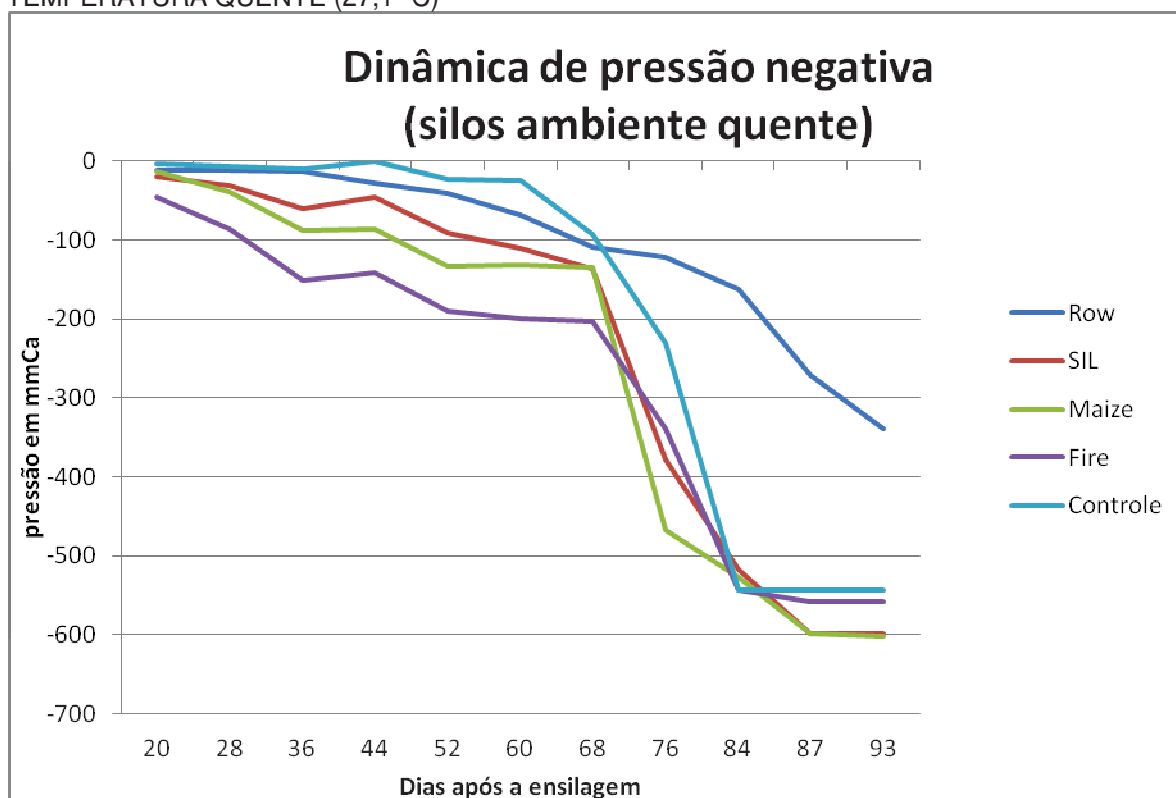
capacidade de converter ácido láctico em acético em condições anaeróbicas gerando  $\text{CO}_2$  como resíduo da conversão.

**FIGURA 12:** PRODUÇÃO DE GÁS COMPARANDO O EFEITO DE TEMPERATURA



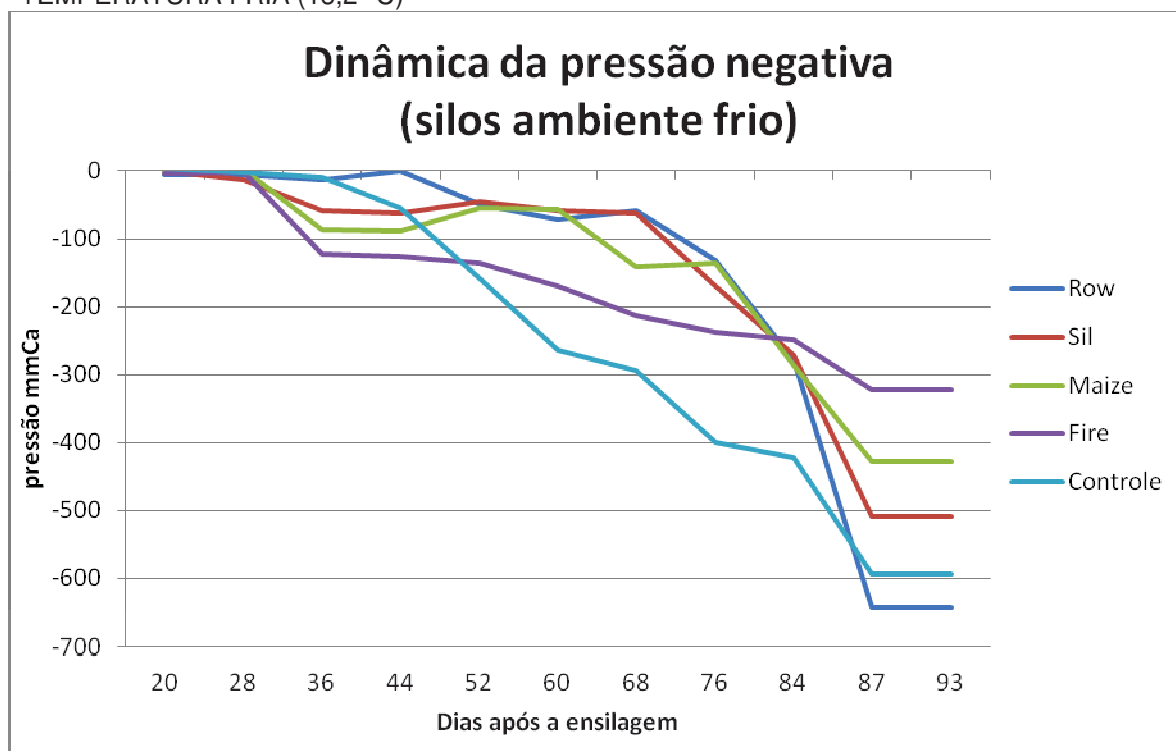
Após o período de produção de gases (em média 120 horas) iniciou-se a fase de estabilização da pressão. Essa etapa permaneceu constante até o décimo sexto dia quando a pressão negativa teve início. Devido à alteração do modelo de manômetro (mercúrio), o efeito de vácuo foi percebido mais lentamente em relação ao experimento anterior. A pressão média encontrada neste ensaio está apresentada nas Figuras 13 e 14.

**FIGURA 13:** DINÂMICA DA PRESSÃO NEGATIVA NOS SILOS ARMAZENADOS EM TEMPERATURA QUENTE (27,1 °C)



É possível notar que a pressão negativa atingida pelos silos é semelhante entre as temperaturas. Os valores médios ao final do ensaio ficaram próximos a  $-611$  mmCA. No entanto, alguns silos apresentaram valores próximos a  $-1300$  mmCA, valores próximos aos encontrados no experimento do capítulo I.

**FIGURA 14:** DINÂMICA DA PRESSÃO NEGATIVA NOS SILOS ARMAZENADOS EM TEMPERATURA FRIA (15,2 °C)



Esses são os primeiros ensaios que avaliaram a pressão interna dos silos e os resultados apresentados aqui apresentam forte indicio que esse efeito tenha origem biológica, por meio do metabolismo de bactérias homoacetogênicas.

## 5.4 CONCLUSÃO

A temperatura ambiente durante o armazenamento influenciou a composição bromatológica das silagens. A menor temperatura ambiente induziu fermentação mais homolática. Nessa condição, o aditivo Fireguard apresentou melhor resposta no controle de leveduras. A ordem de ensilagem parece ser uma importante causa de variação nos ensaios com silagens e deve ser levada em consideração na interpretação dos resultados. Após a fase de produção de gases no início da fermentação, silagens de milho apresentam a formação de pressão negativa, provavelmente decorrente da absorção de gases presentes nos poros da silagem, por bactérias homoacetogênicas.

## 6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações apresentadas nesse trabalho trouxeram importantes avanços ao grupo de pesquisa. Além dos dados referentes aos ensaios conduzidos (temperatura, aditivos, gases e pressão) contribuições adicionais foram trazidas sobre falhas na metodologia. Os achados aqui apresentados indicam pontos de atenção que devem ser considerados na condução dos experimentos com silagem, como: tempo de picagem das plantas, a ordem de ensilagem dos tratamentos, a contaminação cruzada, entre outros. Essas variáveis devem ser levadas em consideração nos próximos ensaios. Outra importante observação diz respeito à qualidade de vedação dos silos experimentais que quando débil compromete todo o processo fermentativo das silagens, dificultando a correta interpretação dos resultados.

A busca e seleção de microrganismos adaptados ao clima tropical parece ser uma importante linha de pesquisa para o Brasil, assim como a investigação das causas de formação de vácuo no interior dos silos experimentais.

A formação de vácuo no interior dos silos é achada constante em todos os experimentos realizados no CPFOR, desde o desenvolvimento da metodologia para avaliação de gases, no ano de 2011. A identificação da geração de pressão negativa no interior dos silos foi uma observação acidental e que despertou nosso interesse na investigação das possíveis causas. Porém, nenhum experimento até o momento foi delineado com o objetivo específico de entendimento desse efeito. Esse trabalho traz informações relevantes sobre esse assunto e que servirão de base para a continuidade dos estudos. O desenvolvimento de manômetro e a obtenção de valores de pressão negativa podem ser considerados importantes avanços iniciais nesse tema. As informações apresentadas na revisão de literatura sobre a possibilidade de atividade das bactérias homoacetogênicas em silagens, precisa ser investigada, mas acreditamos fortemente que esse seja um novo e importante passo no entendimento do processo fermentativo de silagens.

## 7.0 REFERÊNCIAS

- ALVES, S. P., CABRITA, A. R. J., JERÓNIMO, E., BESSA, R. J. B., FONSECA, J. M. Effect of ensiling and silage additives on fatty acid composition of ryegrass and corn experimental silages. **Journal of Animal Science**. v. 89, p. 2537-2545. 2011.
- ASHBELL, G., WEINBERG, Z. G., HEN, Y., and FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 261–263. 2002.
- AUERBACH, H., K. WEISS, and E. NADEAU. Benefits of using silage additives. In: Proceedings of 1° International Silage Summit, Leipzig, Saxony, Germany. H. Auerbach, C. Lückstädt, and F. Weissbach, ed. Anytime Publishing Services, Worthington. p. 75–144. 2012.
- CHARMLEY, E. Towards improved silage quality—A review. Can. **Journal of Animal. Science**. v. 81, p.157–168. 2001.
- DANIEL, J. L. P.; WEIß, K., CUSTÓDIO, L., SÁ NETO, A., SANTOS, M. C., ZOPOLLATTO, M., NUSSIO, L. G. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 185, p. 101-105, 2013.
- GARLOCK, R. J., CHUNDAWAT, S. P. S., VENKATESH, B., DALE, B. E. Optimizing harvest of corn stover fractions based on overall sugar yields following ammonia fiber expansion pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for biofuel**. v. 1, p. 2-29. 2009.
- HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 1791–1794. 1999.
- JAAKKOLA, S., KAUNISTO, V., HUHTANEN, P. Volatile fatty acid proportion and microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage ensiled with different rates of formic acid. **Grass and forage Science**. v. 61, p, 282-292. 2006.
- JENSEN, C., WEISBJERG, M. R., NORGAARD, P., HVELPLUND, T. Effect of maize silage maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. **Animal Feed Science and technology**, Amsterdam, v. 118, p. 279-294, 2005.
- JOBIM, C. C., NUSSIO, L. G., REIS, R. A.; e SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, nº 36, p. 101-120. 2007.
- KIM, S. C., and ADESOGAN, A. T. Influence of ensiling temperature, simulated rainfall, and delayed sealing on fermentation characteristics and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**. V. 89, p. 3122-3132. 2006.

KLEINSCHMIT, D., and KUNG, L. Jr. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**. v. 89. p. 4005-4013. 2006

KNICKY, M., WIBERG, H. G., EIDE, F. GERTZELL, B. Dynamics of gás formation during ensilage. In. Peter Udén; Torsten Eriksson; Bengt-Ove Rustas; Cecilia Müller; Rolf Spröndly; Pauly Thomas. **Proceedings of the 5th Nordic Feed Science Conference**. Uppsala: Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences. p. 41-46. 2014.

KOWALCZYK, M. and BARDOWSKI, J. Regulation of sugar catabolism in *Lactococcus lactis*. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 33, p. 1–13. 2007.

KUNG, L., Jr., AND, MUCK, R. E. Silage additives: Where are we going? In **Proceedings of XVII Int. Silage Conference**., Piracicaba, São Paulo, Brazil. J. L. P. Daniel, G. Morais, D. Junges, and L. G. Nussio, ed. University of Sao Paulo, Piracicaba, SP, Brazil. p. 72-81. 2015.

KUNG, Jr., L., A review on silage additives and enzymes. Disponível em:<https://cpb-us-east-1-uc1ugur1qwqqqo4.stackpathdns.com/blogs.cornell.edu/ist/e/4211/files/2014/04/A-Review-of-Silage-Additives-1dj7idb.pdf>. Acessado em 03/01/2018. 2014

KUNG, Jr. L., and SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage. **Wisconsin Team Forage**. v. 3, nº 13, p. 1-5. 2001.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal and Food Microbiology**. v. 83, p. 115–131. 2003.

LYNCH, J. P., BAAH, J., and BEAUCHEMIN, D. K. A. Conservation, fiber digestibility, and nutritive value of corn harvested at 2 cutting heights and ensiled with fibrolytic enzymes, either alone or with a ferulic acid esterase-producing inoculant. **Journal of Dairy Science**. v. 98, p. 1214–1224. 2015.

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publications. p. 340. 1991.

McDONALD, P., HENDERSON, A. R. and WHITTENBURY, R. The effect of temperature on ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 17, 476-480. 1966.

MUCK, R. E., and L. KUNG Jr. Effects of silage additives on ensiling. In **Proceeding of Silage: Field to Feedbunk North American Conference**. NRAES-99. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY. p. 187-199. 1997.

MUCK, R. E. and DICKERSON, J. T. Storage temperature effects on proteolysis in alfalfa silage. **Transactions of the ASAE**. nº 31, p. 1005-1009. 1988.

NISHINO, N., and UCHIDA, S. Effects of cell wall degrading enzymes and lactic acid bacteria on fermentation of rhodesgrass (*Chloris gayana* Kunth.) silage stored at various ambient temperature. **Grassland Science**. v. 44, p. 193-197. 1998.

OLIVEIRA, A. S., WEINBERG, Z. G., OGUNADE, I. M., CERVANTES, A. A. P., ARRIOLA, K. G., JIANG, Y., KIM, D., LI, X., GONÇALVES, M. C. M., VYAS, D., and ADESOGAN, D. A. T. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 100, p. 4587-4603. 2017.

OUDE-ELFERINK, S. J. W. H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHA L, J. C. and SPOELSTRA, S. F. Silage fermentation processes and their manipulation. In: **FAO Eletronic Conference on Tropical Silage**. FAO, Rome. p. 17-30. 2000.

PAHLOW, G., MUCK, R. E., DRIEHUIS, F. and OUDE ELFERINK, S. J. W. H. Microbiology of ensiling. Ed. Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. 2003. **Silage science and technology**, Madison, Wisconsin, USA. 2003.

PEDROSO, A. F., NUSSIO, L. G., LOURES, D. R. S., PAZIANI, S. F., RIBEIRO, J. L., MARI, L. J., ZOPOLLATTO, M., SCHMIDT, P., MATTOS, W. R. S., HORII, J. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. **Scientia Agricola**, v. 65, nº 6, p. 589-594. 2008.

SANTOS, A. O., ÁVILA, C. L. S., PINTO, J. C., CARVALHO, B. F., DIAS, D. R., and SCHWAN, R. F. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silage inoculated with new tropical lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 120, p. 266-279. 2015.

SILVA, D. J., QUEIROZ, A. C.. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002, 235p.

SOUZA, C. M. Impacto ambiental da produção de silagens: Revisão da literatura e avaliação experimental em silos laboratoriais. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – **Universidade Federal do Paraná, Curitiba**, 2015, 132f.

STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M., ADELBERG, E. **Mundo dos Micróbios**. 1 Ed. São Paulo, SP: Editora Edgard Blücher Ltda, 1969, 741p.

de VRIES, W., KAPTEIJN, W. M., VAN DER BEEK, E. G. and STOUTHAMER, A. H. Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures. **Journal of General Microbiology**. v. 63, p. 333–345. 1970.

WEISS, K., KROSCHEWSKI, B., and AUERBACH, H. Effects of air exposure, temperature and additives on fermentation characteristics, yeast count, aerobic stability and volatile organic compounds in corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 99, n° 10, p. 8053-8069. 2016.

WEISE, G., RETTIG, H., SUCKOW, G. Losses and stability of silage in dependence on the degree of air influence. **Proceedings of the 13th International Grasslands Congress**. v. 9, p. 1337-1340. 1977.

WEINBERG, Z. G., SZAKACS, G., ASHBELL, G. and HEN, Y. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. **Journal Applied of Microbiology**. v. 90, p. 561–566. 2001.

WEINBERG, Z. G., SZAKACS, G., ASHBELL, G., HEN, Y. The effect of temperature and *Lactobacillus amylovorus* and *Lact. plantarum*, applied at ensiling, on wheat silage. **Journal Applied of Microbiology**. v. 84, p. 404-408. 1998.

WEINBERG, Z. G. And ASHBELL, D. G. Changes in gas composition in corn silages in bunker silos during storage and feed out. **Canadian Agricultural Engineering**. v. 36, p. 155-158. 1994.

ZHOU, Y., DROUIN, P., and LAFRANIÈRE, C. Effect of temperature (5-25 °C) on epiphytic lactic acid bacteria population and fermentation of whole-plant corn silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 121, p. 657-671. 2016.

ZOPOLLATTO, M., NUSSIO, L. G., MARI, L. J., SCHMIDT, P., DUARTE, A. P., MOURÃO, G. B. Alterações na composição morfológica em função do estágio de maturação em cultivares de milho para produção de silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 38, n° 3, p. 452-461. 2009.



## 7.1 LISTA GERAL DE REFERÊNCIAS

ABREU, A. A, DANKO, A. S, ALVES, M. M. Bio-hydrogen production in an EGSB reactor under mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic conditions. Presented in poster session PT01 eBiohydrogen. 11<sup>th</sup> IWA World Congress on anaerobic digestions, p. 23-27. 2007.

ADESOGAN, A. T., and KIM, S. C. Factors affecting the quality of corn silage grown in hot, humid areas 1: Effect of delayed sealing, simulated rainfall and ensiling temperature. **Journal of Animal Science**. v. 83, p. 383-387. 2005.

ADESOGAN, A. T., HUISDEN, M., ARRIOLA, K. G., KIM, S. C., FOSTER, J. Factors affecting the quality of corn silage grown in hot, humid areas. 2: Effect of applying two dual-purpose inoculants or molasses. **Journal of Animal Science**. v. 83 (supple. 1). Abstract, 665, p. 383. 2005.

ALVES, S. P., CABRITA, A. R. J., JERÓNIMO, E., BESSA, R. J. B., FONSECA, J. M. Effect of ensiling and silage additives on fatty acid composition of ryegrass and corn experimental silages. **Journal of Animal Science**. v. 89, p. 2537-2545. 2011.

ASHBELL, G., WEINBERG, Z. G., HEN, Y., and FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 261–263. 2002.

ASHBELL, G. and KASHNCHI, Y. In-silo losses from wheat ensiled in bunker silos in a subtropical climate. **Journal Science Agriculture**. v. 40, p. 95 -103. 1987.

ATKINS, P. W., PAULA, J. **Físico-química**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. Volume 2. 2008.

AUERBACH, H., K. WEISS, and E. NADEAU. Benefits of using silage additives. In Proceedings of 1<sup>o</sup> International Silage Summit, Leipzig, Saxony, Germany. H. Auerbach, C. Lückstädt, and F. Weissbach, ed. Anytime Publishing Services, Worthington. p. 75–144. 2012.

ÁVILA, C. L. S., CARVALHO, B. F., PINTO, J. C., DUARTE, W. F., SCHWAN, R. F., The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of Animal Science**. V. 97, n° 2, p. 940-951. 2014.

BASSO, F. C., BERNARDES, T. F.; ROTH, A. P. T. P.; LODO, B. N.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 41, n° 7, p. 1789-1794. 2012.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperature, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety**. v. 3, p. 1-20. 2004.

BOGA, H., and BRUNE, A. Oxygen reduction by homoacetogenic bacteria. **Abstracts Annual Meeting**. Verein. Allgem. Angewand. Mikrobiol. BioSpectrum. München, Abstract, 15, p.143. 2000.

BOTELHO, A. M. Aumento da produção de biomassa de *Clostridium carboxidivorans* utilizando gás de síntese para fins biotecnológicos. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – **Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2016, 79f.

BUCKEL, W., THAUER, R. K. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na<sup>+</sup> translocating ferredoxin oxidation. **Biochimica et Biophysica Acta -Bioenergetics**, v. 1827, n° 2, p. 94-113, 2013.

CHARMLEY, E. Towards improved silage quality—A review. Can. **Journal of Animal Science**. v. 81, p.157–168. 2001.

CHEN, A. C., OHASHI, A., HARADA, H. Acetate synthesis from H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> in simulated and actual landfill samples. **Environment Technology**. v. 24, p. 435–443. 2003.

COURTIN, M. G., and SPOELSTRA, S. F. A simulation model of the microbiological and chemical changes accompanying the initial stage of aerobic deterioration of silage. **Grass Forage Science**. v. 45, p.153-165. 1990.

DANIEL, J. L. P. and NUSSIO, L. G. A simple and reliable system for measuring gas production kinetics during silage fermentation in lab scale silos. In: Daniel J.L.P., Morais G., Junges D. and Nussio L.G. (eds.) **Proceedings of the XVII International Silage Conference**, ESALQ, Piracicaba, Brazil, pp. 576-577.2015

DANIEL, J. L. P.; WEIß, K., CUSTÓDIO, L., SÁ NETO, A., SANTOS, M. C., ZOPOLLATTO, M., NUSSIO, L. G. Occurrence of volatile organic compounds in sugarcane silages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 185, p. 101-105, 2013.

DAVIES, D. R. Silages inoculants – Where next? **Proceedings 14<sup>th</sup> International Symposium Forage conservation**, Brno, Czech Republic, p. 32-39. 2010.

DEVARAPALLI, M., ATIYEH, H. A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. **Biofuel Research Journal**. n° 7, p. 268-280. 2015.

DEWAR, W. A., McDONALD, P., and WHITTENBURY, R. The hydrolysis of grass hemicelluloses during ensilage. **Journal Science Food Agriculture**. v. 14, p. 411-417. 1963.

DINAMARCA, C. S. Homoacetogenic H<sub>2</sub> consumption in fermentative hydrogen production processes. Ph.D. thesis. **Norwegian University of Science and Technology**. 182f. 2010.

DRAKE, H. L. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA “Wood/Ljungdahl” pathway: past and current perspectives. In: **Drake H. L., editor. Acetogenesis**. New York: Chapman and Hall; 1994.

DRAKE, H. L. and KÜSEL, K. How the diverse physiologic potentials of acetogens determine their in situ realities. In: Ljungdahl, L.G., Adams, M.W. Barton, L.L., Ferry, J.G. & Johnson, M.K. (eds.). **Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria**. New York, USA: Springer. p. 171-190. 2003.

DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, S. J. W. H., and SPOLSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**. n° 87. p. 583-594. 1999.

DRIEHUIS, F.; S. F. SPOELSTRA; S. C. J. COLE; R. AND MORGAN. Improving aerobic stability by inoculation with *Lactobacillus buchneri*. **Proceedings. of the XI International Silage Conference**, IGER, Aberystwyth. p. 106-107. 1996.

FAIRBAIRN, R. L., ALLI, I., PHILLIP, L. E. Proteolysis and amino acid degradation during ensilage of untreated or formic acid-treated lucerne and maize. **Grass and Forage Science**, n° 47, p. 382–390. 1992.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of applied Microbiology**. v. 95, p.1080-1086. 2003

FITZSIMONS, A., HOLS, P., JORE, J., LEER, R. J., O’CONNELL, M., DELCOUR, J Development of an amylolytic *Lactobacillus plantarum* silage strain expressing the *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase gene. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, n° 10, p. 3529-3535. 1994.

GARCIA, A. D., OLSON, W. G., OTTERBY D. E., LINN J. G., and HANSEN, W. P. Effects of temperature, moisture, and aeration on fermentation of alfalfa silage. **Journal Dairy Science**. v. 72: 93-103. 1989.

GARLOCK, R. J., CHUNDAWAT, S. P. S., VENKATESH, B., DALE, B. E. Optimizing harvest of corn stover fractions based on overall sugar yields following ammonia fiber expansion pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for biofuel**. v. 1, p. 2-29. 2009.

GUJER, W., ZEHNDER, A. J. B. Conversion processes in anaerobic digestion. **Wat Science Technology**. v. 15, p.127-167. 1983.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 1791–1794. 1999.

HAFNER, S. D., MONTES, F., ROTZ, C. A., MITLOEHNER, F. Ethanol emission from loose corn silage and exposed silage particles. **Atmospheric Environment**. v. 44, p. 4172-4180. 2010.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p.1791–1794. 1999.

HORIUCHI, J., SHIMIZU, T., KANNO, T., KOBAYASHI, M. Dynamic behavior in response to pH shift during anaerobic acidogenesis with a chemstat culture. **Biotech Tech**. v.13. p.155-167. 1999.

JAANKOLA, S., KAUNISTO, V., HUHTANEN, P. Volatile fatty acid proportion and microbial protein synthesis in the rumen of cattle receiving grass silage ensiled with different rates of formic acid. **Grass and forage Science**. v. 61, p. 282-292. 2006.

JENSEN, C., WEISBJERG, M. R., NORGAARD, P., HVELPLUND, T. Effect of maize silage maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. **Animal Feed Science and technology**, Amsterdam, v. 118, p. 279-294, 2005.

JOBIM, C. C., NUSSIO, L. G., REIS, R. A.; e SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**. nº 36, p.101-120. 2007.

KIM, S. C., and ADESOGAN, A. T. Influence of ensiling temperature, simulated rainfall, and delayed sealing on fermentation characteristics and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 3122-3132. 2006.

KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., e REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 41, p.103-125. 1998.

KLEINSCHMIT, D., and KUNG, L. Jr. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 4005-4013. 2006

KLEINSCHMIT D. H., SCHMIDT, R. J., and KUNG, L. Jr, The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 2130–2139. 2005.

KNICKY, M., WIBERG, H. G., EIDE, F. GERTZELL, B. Dynamics of gás formation during ensilage. In. Peter Udén; Torsten Eriksson; Bengt-Ove Rustas; Cecilia Müller; Rolf Spröndly; Pauly Thomas. Proceedings of the 5th Nordic Feed Science Conference. Uppsala: Department of Animal Nutrition and Management, Swedish **University of Agricultural Sciences**. p. 41-46. 2014.

KNICKÝ, M., SPÖRNDLY, R. Sodium benzoate, potassium sorbate and sodium nitrite as silage additives. **Journal Science Food Agriculture**. V. 89, p. 2659-2667. 2009.

KOTSYURBENKO, O. R., FRIEDRICH, M. W., SIMANKOVA, M. V., NOZHEVNIKOVA, A. N., GOLYSHIN, P. N., TIMMIS, K. N. Shift from acetoclastic to H<sub>2</sub>-dependent methanogenesis in a west siberian peat bog at low pH values and isolation of na acidophilic methanobacterium strain. **Applied Environmental Microbiology**. v. 73, nº 7, p. 2344-2358. 2007.

KOWALCZYK, M. and BARDOWSKI, J. Regulation of sugar catabolism in *Lactococcus lactis*. **Critical Reviews Microbiology**. v. 33, p. 1–13. 2007.

KROONEMAN, J., FABER, F., ALDERKAMP, A. C., OUDE ELFERINK, S.J.H.W., DRIEHUIS, F., CLEENWERCK, I., SWINGS, J., GOTTSCHAL, J. C., and VANCANNEYT, M. *Lactobacillus diolivorans* sp. Nov., a 1,2 propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 52, p. 639-646. 2002.

KUNG, L., Jr., AND, MUCK, R. E. Silage additives: Where are we going? **In: Proceeding of XVII Int. Silage Conference**. Piracicaba, São Paulo, Brazil. J. L. P. Daniel, G. Morais, D. Junges, and L. G. Nussio, ed. University of Sao Paulo, Piracicaba, SP, Brazil. p. 72-81. 2015.

KUNG, Jr., L. A review on silage additives and enzymes. Disponível em: <https://cpb-us-east-1-juc1ugur1qwqqqo4.stackpathdns.com/blogs.cornell.edu/dist/e/4211/files/2014/04/A-Review-of-Silage-Additives-1dj7idb.pdf>. Acessado em 03/01/2018. 2014.

KUNG Jr, L. Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment. **California alfalfa & forage symposium**, 1-2 December. 2010.

KUNG Jr., L. Potential factors that may limit the effectiveness of silage additives. **In. Proceeding XV International Silage Conference**, Madison, WI. p. 37-45. 2009

KUNG Jr., L., STOKES, M. R., LIN, C. J. Silage additives. In: Silage Science and Technology. Agronomy Monograph 42 (Eds Buxton D. R., Muck R. E, Harrison J. H.), **America Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America**, Madison, p. 305–360. 2003.

KUNG, Jr. L., and SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage. **Wisconsin Team Forage**. v. 3, nº 13, p. 1-5. 2001.

KUNG Jr., L., TUNG, R. S., MACIOROWSKI, K., BUFFUM, K., KNUTSEN, K., and AIMUTIS, W. R. Cell wall degrading enzymes and lactic acid bacteria as silage additives. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 4284-4296. 1991.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal Food Microbiology**. v. 83, p. 115–131. 2003.

LYNCH, J. P., BAAH, J., and BEAUCHEMIN, D. K. A. Conservation, fiber digestibility, and nutritive value of corn harvested at 2 cutting heights and ensiled with fibrolytic enzymes, either alone or with a ferulic acid esterase-producing inoculant. **Journal of Dairy Science**. v. 98, p. 1214–1224. 2015.

LATIF, H., ZEIDAN, A. A., NIELSEN, A. T., ZENGLER, K. Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. **Current Opinion Biotechnology**. v. 27, p. 79-87. 2014.

LJUNGDAHL, L. G. The acetyl-CoA pathway and the chemiosmotic generation of ATP during acetogenesis. In: Drake HL (Ed) Acetogenesis, (pp 63–87). **Chapman and Hall**, New York. 1994.

LJUNGDAHL, L. G., WOOD, H, G. Total synthesis of acetate from CO<sub>2</sub> by heterotrophic bacteria. **Annual review of Microbiology**. v. 23, p. 515-538. 1969.

LUO, G., KARAKASHEV, D., XIE, L., ZHOU, Q., ANGELIDAKI, I. Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. **Biotechnol Bioengineering**. v. 108. n° 8, p. 1816-1827. 2011.

McALLAN, A. B., and PHIPPS, R. H., the effect of sample date and plant density on the carbohydrate content of forage maize and the changes that occur on ensiling. **Journal Agriculture Science**. v. 89, p. 589-597. 1977.

McDONALD, P., HENDERSON, A. R., and HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe Publications. p. 340. 1991.

McDONALD, P., HENDERSON, A. R. and WHITTENBURY, R. The effect of temperature on ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 17, 476-480. 1966.

MUCK, R. E., MOSER, L. E., and PITT, R. E.. Postharvest factors affecting ensiling. In: D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison (Eds), Silage Science and Technology. Madison, WI: **American Society of Agronomy**. p. 251-304. 2003.

MUCK, R. E., and HOLMES, B. J. Factors affecting bunker silo densities. **Proceedings of the XII International Silage Conference, Uppsala, Sweden**, July 5-7 p. 278–279. 1999.



MUCK, R. E., and DICKERSON, J. T. Storage temperature effects on proteolysis in alfalfa silage. **Transactions of the ASAE**. nº 31, p. 1005-1009. 1988.

MUCK, R. E., and KUNG Jr., L. Effects of silage additives on ensiling. In **Proc. Silage: Field to Feedbunk North American Conference**. NRAES-99. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY. p. 187-199. 1997.

MUCK, R. E. Dry matter level affects alfalfa silage quality: Nitrogen transformations. **Transactions of the ASAE** v. 30, p. 7-14. 1987

MUCK, R. E., and DICKERSON, J. T. Storage temperature effects on proteolysis in alfalfa silage. **Transactions of the ASAE**, nº 31, p. 1005-1009. 1988.

MUNASINGHE, P. C., KHANAL, S. K. Bio-mass-derived syngas fermentation into biofuels. **Biofuels**. v. 101, nº 13, p. 79-98. 2011.

NIE, Y. Q., LIU, H. E., DU, GUOCHENG., CHEN, J. I. Acetate yield increased by gas circulation and fed-batch fermentation in a novel syntrophic acetogenesis and homoacetogenesis coupling system. **Bioresour Technology**. v. 99, p. 2989-2995, 2008.

NIE, Y. Q., LIU, H. E., DU, GUOCHENG., CHEN, J. I. Enhancement of acetate production by a novel coupled syntrophic acetogenesis with homoacetogenesis process. **Process Biochemistry**. v. 42, p. 599-605. 2007.

NOVINSKI, C. O., da SILVA, E. P., RESTELATTO, R., PEREIRA, L. M., ZOPOLLATTO, M., SCHMIDT, P. Anaerobic respiration by epiphytic microbial in corn silage. In: **Anais da 53ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Gramado-RS. 2016.

NISHINO, N., and UCHIDA, S. Effects of cell wall degrading enzymes and lactic acid bacteria on fermentation of rhodesgrass (*Chloris gayana* Kunth.) silage stored at various ambient temperature. **Grassland Science**. v. 44, p. 193-197. 1998.

OLIVEIRA, A. S., WEINBERG, Z. G., OGUNADE, I. M., CERVANTES, A. A. P., ARRIOLA, K. G., JIANG, Y., KIM, D., LI, X., GONÇALVES, M. C. M., VYAS, D., and ADESOGAN, D. A. T. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.100, p. 4587-4603. 2017.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H., KROONEMAN, J., GOTTSCHAL, J. C., SPOELSTRA, S. F., FABER, F., and DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 67. p. 125-132. 2001.

OUDE-ELFERINK, S. J. W. H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHA L, J. C. and SPOELSTRA, S. F. Silage fermentation processes and their manipulation. In: **FAO Eletronic Conference on Tropical Silage**. FAO, Rome. p. 17-30. 2000.

PAHLOW, G., MUCK, R. E., DRIEHUIS, F. and OUDE ELFERINK, S. J. W. H. Microbiology of ensiling. Ed. Buxton, D. R., Muck, R. E. & Harrison, J. H. 2003. **Silage science and technology**, Madison, Wisconsin, USA. 2003.

PARAWIRA, W., MURTO, M., ZVAUYA, R., MATTIASSON, B. Anaerobic batch digestion of solid potato waste alone and in combination with sugar beet leaves. **Renewable Energy**. v. 29, p. 1811-1823. 2004.

PEDROSO, A. F., NUSSIO, L. G., LOURES, D. R. S., PAZIANI, S. F., RIBEIRO, J. L., MARI, L. J., ZOPOLLATTO, M., SCHMIDT, P., MATTOS, W. R. S., HORII, J. Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. **Scientia Agricola**, v. 65, nº 6, p. 589-594. 2008.

PITT, R. E. Silage and hay preservation. Northeast Regional Agricultural Engineering Service (NRAES), **Cooperative Extension, Ithaca**. 1990.

RYAN, P., MCHUGH, S., GOLDEN, T., COLLERAN, E. Investigation of homoacetogenesis bacterial activity during mesophilic, thermophilic and psychrophilic anaerobic digestion. *Proc ESAI environ.* p. 61-64. 2005

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.1, p. 1-20. 2013.

SANCHEZ, R. F., CAMERON, D. C., and COONEY, C. L. Influence of environmental factors in the production of (R)-1,2 propanediol and acetol by *Clostridium thermosaccharolyticum*. **Biotechnology Letters**. v. 9. p. 449-454. 1987.

SANTOS, W. P., ÁVILA, C. L. S., PEREIRA, M. N., SCHWAN, R. F., LOPES, N. M., PINTO, J. C. Effect of the inoculation of sugarcane silage with *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus buchneri* on feeding behavior and milk yield of dairy cows. **Journal of Animal Science**. v. 95, nº 10. p. 4613-4622. 2017.

SANTOS, A. O., ÁVILA, C. L. S., PINTO, J. C., CARVALHO, B. F., DIAS, D. R., and SCHWAN, R. F. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silage inoculated with new tropical lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 120, p. 266-279. 2015.

SCHMIDT, P., NOVINSKI, C. O., CARNEIRO, E. W. and BAYER, C. Greenhouse gas emissions from fermentation of corn silage, In: Kuoppala, K., Rinne, M., & Vanhat-alo, A. (eds). **Proceedings of the XVI International Silage Conference, Hämeenlinna, Finland**, 2012, p. 448-449. 2012

SCHMIDT, P., NUSSIO, L. G., QUEIROZ, O. C. M., SANTOS, M. C., ZOPOLLATTO, M., TOLEDO FILHO, S. G., DANIEL, J. L. P. Effects of



*Lactobacillus buchneri* on the nutritive value of sugarcane silage for finishing beef bulls. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n° 1, p. 8-13. 2014.

SCHEIRLINCK, T., DE MEUTTER, J., ARNAUT, G., JOOS, H., CLAEYSSSENS, M., MICHELIS, F. Cloning and expression of cellulose and xylanase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 33, p. 534-541.1990.

da SILVA, E. B., SAVAGE, R. M., POLUKIS, S. A., SMITH, M. L., GRAY, A. M., MESTER, R. N., and KUNG Jr. L. Effectiveness of a chemical additive on improving the aerobic stability of corn silage after short periods of ensiling. **Journal Dairy Science**. 100(Suppl. 2):263 (Abstr.). 2017.

SILVA, N. C., SANTOS, J. P., ÁVILA, C. L. S., EVANGELISTA, A. R., CASAGRANDE, D. R., BERNARDES, T. F. Evaluation of the effects of two *Lactobacillus buchneri* strains and sodium benzoate on the characteristics of corn silage in a hot-climate environment. *Grassland Science*, v. 60, p. 169-177. 2014.

SILVA, D. J., QUEIROZ, A. C.. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002, 235p.**

SKONIESKI, F. R., VIÉGAS, J.; MARTIN, T. N.; NÖRNBERG, J. L.; MEINERZ, G. R.; TONIN, T. J.; BERNHARD, P.; FRATA, M. T. Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 46. n° 9, p. 722-730. 2017.

SOUZA, C. M. Impacto ambiental da produção de silagens: Revisão da literatura e avaliação experimental em silos laboratoriais. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – **Universidade Federal do Paraná, Curitiba**, 2015, 132f.

SPOELSTRA, S. F., COURTIN, M. G., and VAN BEERS, J. A. C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal Agriculture Science**, Cambridge. v. 111. p. 127-132. 1988.

SUCU, E., KALKAN, H., CANBOLAT, O., FILYA, I. Effects of ensiling density on nutritive value of maize and sorghum silages. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 45. n° 10, p. 593-603. 2017.

SUZUKI, T., and H. ONISHI. Aerobic dissimilation of  $\alpha$ -rhamnose and the production of  $\alpha$ -rhamnoic acid and 1,2 propanediol by yeast. *Agricultural and Biology Chemistry*. v. 32, p. 888-893. 1968.

STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M., ADELBERG, E. **Mundo dos Micróbios. 1 Ed. São Paulo**, SP: Editora Edgard Blücher Ltda, 1969, 741p.

SZIKSZAY, M. Geoquímica das águas. *Boletim IG. USP*, Série Didática n° 5, **Universidade de São Paulo**, 34p. 1993.

TELLER, R. S., R. J. SCHMIDT, L. W. WHITLOW, and L. KUNG Jr. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p. 1428–1436. 2012.

TREMBLAY, P. L., ZHANG, T., SHABIR, A. D., LEANG, C., LOVLEY, D. R. The Rnf Complex of *Clostridium ljungdahlii* Is a Proton-Translocating Ferredoxin: NAD<sup>+</sup> Oxidoreductase Essential for Autotrophic Growth. **mBio**, v. 4, n° 1, p. 406–412. 2012.

URIARTE-ARCHUNDIA, M. E., BOLSEN, K. K., BRENT, B. E. A study of the chemical and microbial changes in whole-plant corn silage during fermentation and storage: effects of packing density and sealing technique. Kansas **Agricultural Experiment Station Research Report**., v. 1. n° 347, p.146-150. 2002.

de VRIES, W., KAPTEIJN, W. M., VAN DER BEEK, E. G. and STOUTHAMER, A. H. Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures. **Journal General Microbiology**. v. 63, p. 333–345. 1970.

WANG, J., WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 34, n° 2, p. 799–811. 2009.

WEISS, K., KROSCHEWSKI, B., and AUERBACH, H. Effects of air exposure, temperature and additives on fermentation characteristics, yeast count, aerobic stability and volatile organic compounds in corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 99, n° 10, p. 8053-8069. 2016.

WEISE, G., RETTIG, H., SUCKOW, G. Losses and stability of silage in dependence on the degree of air influence. **Proceedings of the 13th International Grasslands Congress**. v. 9, p. 1337-1340. 1977.

WEINBERG, Z. G., SZAKACS, G., ASHBELL, G. and HEN, Y. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. **Journal Applied of Microbiology**. v. 90, p. 561–566. 2001.

WEINBERG, Z. G., SZAKACS, G., ASHBELL, G., HEN, Y. The effect of temperature and *Lactobacillus amylovorus* and *Lact. plantarum*, applied at ensiling, on wheat silage. **Journal Applied of Microbiology**. v. 84, p. 404-408. 1998.

WEINBERG, Z. G., MUCK, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS microbiology Reviews**. n° 19, p. 53-68. 1996.

WEINBERG, Z. G. And ASHBELL, D. G. Changes in gas composition in corn silages in bunker silos during storage and feed out. **Canadian Agricultural Engineering**. v. 36, p. 155-158. 1994.

WEISSBACH, F. The future of forage conservation. In: II International Symposium on Forage Quality and Conservation: 2., São Pedro, 2011. **Proceeding... Piracicaba: FEALQ**, 2011, p. 319-363. 2011.

WIEGEL, J., TANNER, R., RAINEY, F. An introduction to the family Clostridiaceae. In: Dworkin M, editor. **The prokaryotes. New York: Springer**. p. 654-678. 2006.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effect of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 101-116. 1990.

ZHANG, F., DING, J., ZHANG, Y., CHEN, M., DING, Z. W., LOOSDRECHT, M. C. M., ZENG, R. J. Fatty acids production from hydrogen and carbon dioxide by mixed culture in the membrane biofilm reactor. **Water research**. v. 47. nº 16, p. 6122-6129. 2013.

ZHOU, Y., DROUIN, P., and LAFRANIÈRE, C. Effect of temperature (5-25 °C) on epiphytic lactic acid bacteria population and fermentation of whole-plant corn silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 121, p. 657-671. 2016.

ZOETEMEYER, R. J., VAN DEN HEUVEL, J. C., COHEN, A. pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester. **Water Res.** v.16, p. 303.1982.

ZOPOLLATTO, M., NUSSIO, L. G., MARI, L. J., SCHMIDT, P., DUARTE, A. P., MOURÃO, G. B. Alterações na composição morfológica em função do estágio de maturação em cultivares de milho para produção de silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 38, nº 3, p. 452-461. 2009.